

**UNTERSUCHUNGEN DER FLAGELLEN VON  
*PYROCOCCUS FURIOSUS*:  
FLAGELLENVERMITTELTE INTERAKTIONEN,  
ULTRASTRUKTUR UND MOLEKULARBIOLOGIE**



**DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
**Simone Schopf**  
aus St. Oswald-Riedlhütte

März 2011



Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. R. Wirth

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.03.2011

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender	Prof. Dr. S. Schneuwly
1. Gutachter und Prüfer	Prof. Dr. R. Wirth
2. Gutachter und Prüfer	Prof. Dr. R. Rachel
3. Gutachter	Prof. Dr. R. Sterner
Ersatzprüfer	PD Dr. W. Hausner





## Publikationsliste

Schopf, S., Wanner, G., Rachel, R., and Wirth, R. (2008). An archaeal bi-species biofilm formed by *Pyrococcus furiosus* and *Methanopyrus kandleri*. Arch. Microbiol. 190, 371-377.

Rachel, R., Meyer, C., Klingl, A., Gürster, S., Heimerl, T., Wasserburger, N., Burghardt, T., Küper, U., Bellack, A., Schopf, S., Wirth, R., Huber, H., and Wanner, G. (2010). Analysis of the ultrastructure of archaea by electron microscopy. Methods Cell. Biol. 96, 47-69.

Wirth, R., Bellack, A., Bertl, M., Bilek, Y., Heimerl, T., Herzog, B., Leisner, M., Probst, A., Rachel, R., Sarbu, C., Schopf, S., and Wanner, G. (2011). The Mode of Cell Wall Growth in Selected Archaea Follows the General Mode of Cell Wall Growth in Bacteria - An Analysis using Fluorescent Dyes. Appl. Environ. Microbiol. 77, 1556-1562.



***Manches fängt klein an, manches groß.  
Aber manchmal ist das Kleinste das  
Größte!***

*(unbekannter Verfasser)*



# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Mikrobielle Zellanhänge und ihre Funktion.....	1
1.2	Die Flagellen von <i>Pyrococcus furiosus</i> .....	3
1.2.1	Eine Betrachtung auf Genebene.....	4
1.2.2	Eine Betrachtung auf Proteinebene .....	5
1.2.3	Eine Betrachtung auf funktioneller Ebene .....	6
1.3	Cokulturen auf der Basis einer H <sub>2</sub> -Syntrophie .....	7
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit .....	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1	Substanzen und Bezugsquellen .....	10
2.1.1	Chemikalien.....	10
2.1.2	Enzyme .....	11
2.1.3	Vektoren.....	12
2.1.4	Antikörper .....	12
2.1.5	Molekularmassenstandards.....	13
2.1.6	Antibiotika.....	13
2.1.7	Oligonukleotide.....	14
2.1.8	Reaktionskits .....	15
2.1.9	Verbrauchsgegenstände.....	15
2.1.10	Geräte .....	16
2.1.11	Materialien für Aufwuchsversuche .....	17
2.2	Kulturmedien.....	18
2.2.1	Herstellung aerober Medien.....	18
2.2.2	Luria-Bertani (LB) Medium für <i>E. coli</i> .....	19
2.2.3	SOB-Medium.....	19
2.2.4	Herstellung anaerober Medien.....	19
2.2.5	SME-Medium für <i>P. furiosus</i> , <i>M. kandleri</i> und die Cokultur .....	20
2.3	Verwendete Organismen .....	21
2.4	Kultivierung.....	22
2.4.1	Wachstumsbedingungen der Organismen .....	22
2.4.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	22
2.4.3	Kleinanbauten von <i>P. furiosus</i> , <i>M. kandleri</i> und der Cokultur .....	22
2.4.4	Anzucht von Organismen auf festen Oberflächen.....	23
2.4.5	Anlegen von Glycerinkulturen .....	23
2.5	Sterilisation .....	23

<b>2.6</b>	<b>Mikroskopie .....</b>	<b>24</b>
2.6.1	Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie .....	24
2.6.2	Bestimmung der Gesamtzellzahl .....	24
2.6.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	24
	Herstellung von Suspensionspräparaten .....	25
	Negativkontrastierung .....	25
	Tomographie .....	25
2.6.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	26
<b>2.7</b>	<b>Fluoreszenzfärbungen .....</b>	<b>27</b>
2.7.1	DAPI-Färbung .....	27
2.7.2	Färbung von Zellen mit AlexaFluor® .....	27
2.7.3	Kopplung von Antikörpern mit AlexaFluor® .....	27
<b>2.8</b>	<b>Isolierung und Analytik von Nukleinsäuren .....</b>	<b>28</b>
2.8.1	Allgemeine Hinweise zum Umgang mit RNA .....	28
2.8.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>P. furiosus</i> .....	28
2.8.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>P. furiosus</i> .....	29
2.8.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	29
2.8.5	Ethanolfällung von Nukleinsäuren .....	29
2.8.6	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	29
2.8.7	Native Agarose-Gelelektrophorese zur Analytik von DNA .....	30
2.8.8	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur RNA-Analytik .....	30
2.8.9	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese für Northern Blot .....	31
<b>2.9</b>	<b>Polymerase-Chain-Reaction (PCR) .....</b>	<b>32</b>
2.9.1	Durchführung einer PCR .....	32
2.9.2	Amplifikation von Genen für anschließende Klonierung .....	32
2.9.3	Kolonie-PCR .....	33
2.9.4	Amplifikation archaeeller 16S rRNA-Gene .....	33
2.9.5	Amplifikation von cDNA für in vitro-Transkription .....	34
<b>2.10</b>	<b>Reverse Transkription .....</b>	<b>35</b>
<b>2.11</b>	<b>Blotting von Nukleinsäuren .....</b>	<b>36</b>
2.11.1	DIG-Markierung von RNA-Sonden .....	36
2.11.2	Durchführung des Northern Blots .....	36
2.11.3	Färbung von Blot-Membranen .....	38
2.11.4	Fixierung von Nukleinsäuren auf Blot-Membranen .....	38
2.11.5	Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden .....	38
2.11.6	Detektion über Chemilumineszenz .....	39

<b>2.12 Klonierung</b>	<b>39</b>
2.12.1 Reinigung von PCR-Fragmenten	40
2.12.2 Restriktionsverdau und Ligation	40
2.12.3 Herstellung kompetenter Zellen	40
Elektrokompetente Zellen	40
Chemisch kompetente Zellen	41
2.12.4 Transformation	41
Elektroporation	41
Heatshock	42
2.12.5 Screening von Transformanten	42
2.12.6 DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse	43
<b>2.13 Isolierung von Zellkomponenten</b>	<b>43</b>
2.13.1 Zellaufschluss von <i>P. furiosus</i>	43
2.13.2 Zellaufschluss von <i>M. kandleri</i>	44
2.13.3 Isolierung der Oberflächenproteine von <i>M. kandleri</i>	44
2.13.4 Präparation des S-Layers von <i>P. furiosus</i>	44
<b>2.14 Präparation der Flagellen von <i>P. furiosus</i></b>	<b>45</b>
2.14.1 Zellyse und differentielle Zentrifugation	45
2.14.2 Solubilisierung der Membranproteine	46
2.14.3 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	46
2.14.4 Isolierung und Dialyse der Fraktionen	47
<b>2.15 Polymerisationsstudie an Flagellen</b>	<b>47</b>
2.15.1 Depolymerisation	47
2.15.2 Repolymerisation von Monomeren	47
<b>2.16 Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>48</b>
2.16.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	48
2.16.2 TCA-Fällung	48
2.16.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970)	48
2.16.4 2-Dimensionale SDS-PAGE	49
2.16.5 High Resolution Clear Native Electrophoresis (Wittig et al., 2007)	50
2.16.6 Färbung von SDS-Gelen	52
Coomassie-Färbung	52
Silberfärbung	52
2.16.7 Aufbewahrung von SDS-Gelen	53
2.16.8 Proteinsequenzierung	54
N-terminale Sequenzierung	54
In-Gel-Verdau und MALDI-TOF MS/MS	54

2.16.9	Bioinformatische Analysen .....	54
<b>2.17</b>	<b>Blotting von Proteinen .....</b>	<b>55</b>
2.17.1	Ein-Puffersystem nach Towbin et al. (1979) .....	55
2.17.2	Drei-Puffer System nach Kyhse-Anderson (1984) .....	55
2.17.3	Färbung von PDVF Membranen.....	56
<b>2.18</b>	<b>Expression rekombinanter Proteine .....</b>	<b>56</b>
2.18.1	Proteinexpression im Impact-CN-System .....	56
2.18.2	Proteinexpression im pET-System .....	57
<b>2.19</b>	<b>Immunologische Methoden .....</b>	<b>58</b>
2.19.1	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Zelloberflächenproteine .....	58
2.19.2	Aufreinigung polyklonaler Antikörper .....	59
2.19.3	Absättigung polyklonaler Antikörperlösungen .....	59
2.19.4	Immuno-Fluoreszenzmarkierung adhätierender Zellen .....	60
2.19.5	Immunoblot .....	60
2.19.6	Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie.....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Flagellenvermittelte Interaktionen bei <i>P. furiosus</i> .....</b>	<b>63</b>
3.1.1	Optimierung der Gasphase für die Cokultur .....	63
3.1.2	Biofilmbildung der Cokultur auf Oberflächen .....	65
3.1.3	Zeitabhängige Entwicklung des Biofilms.....	66
3.1.4	Analyse der dreidimensionalen Biofilmstruktur .....	67
<b>3.2</b>	<b>Veränderung des Adhäsionsverhaltens von <i>P. furiosus</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>3.3</b>	<b>Aufreinigung der Flagellen von <i>P. furiosus</i>.....</b>	<b>78</b>
3.3.1	Abscheren der Zellanhänge mit dem Ultraturrax .....	78
3.3.2	Phasenseparation mit Triton X-114 (Kalmokoff et al., 1988).....	80
3.3.3	Solubilisierung mit Nonidet P40.....	81
	Experimentelle Durchführung .....	81
	Analyse der Flagellenfraktion .....	82
3.3.4	Solubilisierung mit DDM.....	83
	Experimentelle Durchführung .....	83
	Analyse der Flagellenfraktion .....	84
<b>3.4</b>	<b>Analyse flagellenassoziierter Strukturen.....</b>	<b>86</b>
3.4.1	Analyse im TEM.....	86
3.4.2	Identifikation ausgewählter Proteinbanden .....	88
3.4.3	Ultradünnschnitte von Laborstamm-Zellen .....	89
3.4.4	Tomographie der Tubes .....	91



<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung der Flagellen.....</b>	<b>94</b>
3.5.1	Bioinformatische Analysen.....	94
3.5.2	Analyse durch immunologische Methoden.....	96
3.5.3	Analyse über native Gelelektrophorese .....	98
<b>3.6</b>	<b>De- und Repolymerisationsversuche an Flagellen von <i>P. furiosus</i> .....</b>	<b>100</b>
3.6.1	Depolymerisation der Flagellen .....	100
3.6.2	Studien zur Repolymerisation .....	102
<b>3.7</b>	<b>Klonierung von <i>flaB0</i>.....</b>	<b>105</b>
3.7.1	Klonierungsstrategie im Impact-CN-System .....	105
3.7.2	Klonierungsstrategie im pET-System.....	107
<b>3.8</b>	<b>Northern Blotting .....</b>	<b>110</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>112</b>
<b>4.1</b>	<b>Cokultur aus <i>P. furiosus</i> und <i>M. kandleri</i>.....</b>	<b>112</b>
4.1.1	Flagellenvermittelte Interaktionen .....	112
4.1.2	Entwicklung des Bi-Spezies-Biofilms .....	114
4.1.3	Antikörper gegen Oberflächenstrukturen .....	115
<b>4.2</b>	<b>Mikrobielle Adhäsion .....</b>	<b>116</b>
4.2.1	Mikrobielle Adhäsion als multifaktorisches Ereignis .....	116
4.2.2	Die Rolle der Oberfläche für die Biofilmarchitektur.....	116
4.2.3	Veränderung des Adhäsionsverhaltens von <i>P. furiosus</i> .....	118
<b>4.3</b>	<b>Flagellen von <i>P. furiosus</i>.....</b>	<b>119</b>
4.3.1	Untersuchungen an Flagellen .....	119
4.3.2	Analyse flagellenassoziierter Strukturen .....	120
4.3.3	De- und Repolymerisation .....	122
4.3.4	Klonierung und Northern Blotting.....	124
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>126</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	126
6.2	Sequenzen der Flagelline .....	127
6.3	Sequenzierung des 16S rRNA-Gens von <i>P. furiosus</i> Laborstamm .....	128
6.4	Curriculum Vitae .....	129
6.5	Publikationen .....	130
6.6	Tagungsbeiträge .....	130
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>131</b>



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Mikrobielle Zellanhänge und ihre Funktion

Unter dem Begriff „mikrobielle Zellanhänge“ sind extrazelluläre Strukturen bei Archaeen und Bakterien zu verstehen, die sich erheblich in ihrem Aufbau und ihrer Funktion unterscheiden können (Ng et al., 2008). Obwohl die wissenschaftliche Nomenklatur für Zellanhänge z.T. uneinheitlich ist, kann eine Grobeinteilung in flagelläre und nicht-flagelläre Anhänge vorgenommen werden.

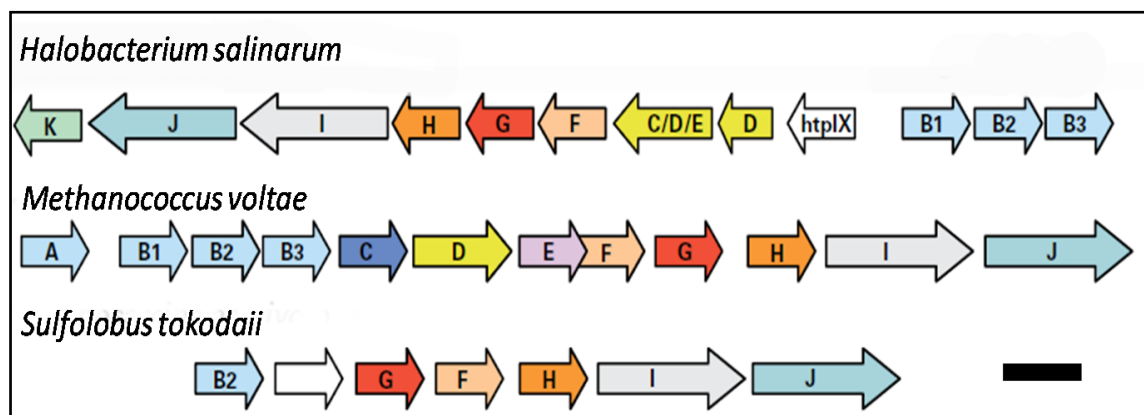
Zellanhänge, die unter die Kategorie „nicht-flagellär“ fallen und vor allem bei Gram-negativen Bakterien weit verbreitet sind, sind Pili und Fimbrien. Mittlerweile ist bekannt, dass diese Zellanhänge auch bei Gram-positiven Bakterien und bei Archaeen vorkommen. Laut einer Definition von Ottow (1975) handelt es sich bei Fimbrien um Adhäsions-Strukturen, bei Pili um Anhänge, die für den Austausch genetischer Information verwendet werden. In der wissenschaftlichen Literatur werden jedoch auch Adhäsions-Strukturen häufig als Pili bezeichnet, was z.B. für die Pap-Pili von uropathogenen *Escherichia coli*-Stämmen zutrifft (Roche und Moxon, 1992). Pili können auch als Informationsträger wirken, wie bei der Transformation von Pflanzenzellen durch den T-Pilus von *Agrobacterium tumefaciens* (Lai und Kado, 2002) oder der Konjugation von *E. coli* mit Hilfe der Sex-Pili (Kim und Komano, 1997). Es ist auch möglich, dass ein Pilityp verschiedene Funktionen übernimmt, wie es z.B. bei Typ IV-Pili der Fall ist. Diese Zellanhänge können eine Rolle bei der Biofilm- und Mikrokoloniebildung, bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, der Aufnahme von DNA, der Signaltransduktion oder Sekretion spielen (Craig und Li, 2008). Aber auch an der Fortbewegung können Typ IV-Pili maßgeblich beteiligt sein, wie bei der „twitching motility“ von beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* (Mattick, 2002) oder dem Gleiten auf festen Oberflächen bei *Myxococcus xanthus* (Kaiser, 2008; Wall und Kaiser, 1999). Viele Gram-negative Pathogene setzen Typ IV-Pili als Adhäsine ein und heften sich so an die Epithelien ihrer Wirte fest (Collins et al., 2005). Bereits seit längerem ist klar, dass Pili-artige Zellanhänge auch bei Archaeen auftreten. Jedoch fehlte ein Nachweis für die Funktion dieser Zellanhänge. Für das Hauptfimbrin Mth60 von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* konnte erstmals gezeigt werden, dass es als Adhäsine wirkt, da festgeheftete Zellen durch eine Behandlung mit anti-Mth60 Antikörpern von der Oberfläche abgelöst werden konnten (Thoma et al., 2008). Pili-artige Zellanhänge, die ebenfalls als Adhäsine wirken, wurden auch in *Sulfolobus solfataricus*, einem Vertreter der Crenarchaeota, gefunden (Szabó et al., 2007). Die Synthese dieser Pili-artigen Anhängsel konnte durch eine Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht induziert werden, was mit einer Autoaggregation der Zellen einherging. Diese Aggregation dient vermutlich dem erleichterten Transfer von DNA zum Schutz der Zellen (Fröls et al., 2008).

Es gibt eine Reihe nicht-flagellärer Zellanhänge, die nur in der Domäne der Archaeen auftreten und weder in die Klasse der Fimbrien noch der Pili eingeordnet werden können. Dazu zählen die Fibers von *Ignicoccus* (Müller et al., 2009), die Hami beim SM1-Euryarchaeum (Moissl et al., 2005) und die Cannulae von *Pyrodictium* (Stetter et al., 1983; Nickell et al., 2003).

Die sicherlich bestuntersuchtesten Zellanhänge sowohl bei Bakterien als auch bei Archaeen sind jedoch die Flagellen, die als rotierende Fortbewegungsorganelle definiert sind (Berg, 2003). Da Flagellation ein weit verbreitetes Phänomen unter Mikroorganismen ist, konnte der Aufbau des Bewegungsapparates gerade bei Bakterien detailliert aufgeklärt werden (Macnab, 2003). Über die Struktur und die Assemblierung der archaeellen Flagelle ist bislang wenig bekannt, außer dass sie sich stark vom bakteriellen Pendant unterscheidet. Anders als die bakterielle Geißel wird die archaeelle Flagelle vermutlich von der Basis her assembliert, da ihr ein passender innerer Zentralkanal zum Transport der einzelnen Bausteine (Flagelline) fehlt (Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2008). Zudem hat die archaeelle Flagelle mit 10-13 nm einen geringeren Durchmesser als die 20 nm dicke bakterielle Geißel (Jarrell und Koval, 1989) und ist häufig über eine N-glykosidische Bindung mit Zuckerresten versehen. Bei den Bakterien ist eine Glykosylierung generell seltener und in Form einer O-glykosidischen Bindung vorzufinden (Voisin et al., 2005; Calo et al., 2010).

Die drei grundlegenden Elemente des Bewegungsapparates, bestehend aus dem Filament, dem Motor und den dazugehörigen Motorswitchkomponenten sind zwar sowohl in der Domäne der Bakterien als auch der Archaeen existent, jedoch handelt es sich dabei um komplett verschiedene Strukturen (Jarrell und McBride, 2008). So lassen sich zu den Proteinen, aus denen der bakterielle Bewegungsapparat aufgebaut ist, keine Homologien im archaeellen Genom finden (Ng et al., 2006). Vielmehr weist die archaeelle Fortbewegungsmaschinerie Ähnlichkeiten zum bakteriellen Typ IV-Pili-System auf (Bardy et al., 2003, Bardy et al., 2004; Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2002). Sowohl Typ IV-Pili, als auch Flagellen sind aus einzelnen Bausteinen (Pilinen bzw. Flagellinen) aufgebaut, die in unterschiedlichen Mengen vertreten sind und somit als Haupt- oder Nebopilinen (bzw. –flagelline) klassifiziert werden. Allen Untereinheiten ist außerdem gemeinsam, dass sie als Präkursorproteine mit einem Klasse III-Signalpeptid synthetisiert werden. Erst nach der Abspaltung des Signalpeptides durch eine Peptidase können die so entstandenen reifen Bausteine durch die Membran geschleust werden, was bei Bakterien über den Typ III-Sekretionsweg geschieht (Mattick et al., 1996; Craig und Li, 2008). Auch bei Archaeen wird das typisch kurze Signalpeptid am N-Terminus durch eine Signalpeptidase (FlaK/PibD) entfernt, die homolog zur bakteriellen Typ IV-Prepilinpeptidase PilD ist (Faguy et al., 1994).

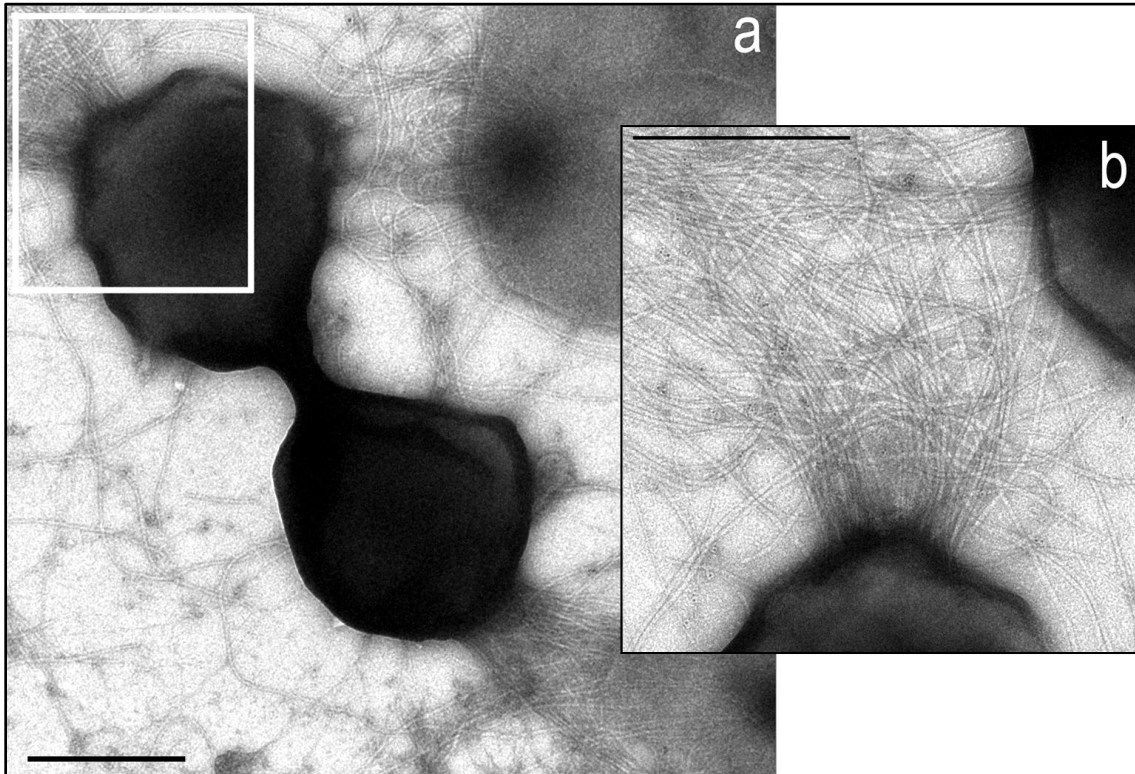
Die am Aufbau des archaeellen Flagellenapparates beteiligten Gene (*fla*-Gene) liegen in einem Operon vor (Ng et al., 2006). Dieses *fla*-Operon beginnt normalerweise mit mehreren Strukturgenen (*flaA* und/oder *flaB* bzw. Unterklassen davon), die für die Flagelline kodieren. Diese werden von einer Reihe assoziierter Gene (*flaC* bis *flaJ*) mit größtenteils unbekannten Funktionen gefolgt. Die Genprodukte FlaI (ATPase) und FlaJ (konserviertes Membranprotein) weisen Homologien zu den Proteinen PilT/PilB/TadA und PilC/TadB aus dem Typ IV-Pili-System auf und werden deswegen als wichtig für die Assemblierung der Flagelle angesehen (Bayley und Jarrell, 1998; Thomas et al., 2001). Anhand genetischer Studien an vorwiegend *Methanococcus* und *Halobacterium* konnte nachgewiesen werden, dass alle *fla*-Genprodukte für den korrekten Aufbau der Flagelle nötig sind (Patenge et al., 2001; Chaban et al., 2007). Während bei den meisten flagellierten Euryarchaeota der komplette Satz an *fla*-Genen vorhanden ist (Abb. 1-1: *Halobacterium salinarum* und *Methanococcus voltae*), liegt dieser bei den Crenarcheota nur in reduzierter Form vor (Abb. 1-1: *Sulfolobus tokodaii*).



**Abbildung 1-1: Das *fla*-Operon am Beispiel ausgewählter Archaeen.** Stromabwärts der Flagellinegene *flaA* und/oder *flaB* liegen die *fla*-assoziierten Gene (*flaC*-*flaJ*) teilweise (*Sulfolobus tokodaii*) oder komplett (*Halobacterium salinarum* und *Methanococcus voltae*) vor (aus Ng et al., 2006, modifiziert); Größenstandard 1 kb.

## 1.2 Die Flagellen von *Pyrococcus furiosus*

*Pyrococcus furiosus* ist ein stark begeißelter Vertreter der *Thermococcales*, welche den Euryarchaeota angehören. Die anaerobe Kokke (Durchmesser von 0,8-2,5 µm) bevorzugt hyperthermophile Bedingungen und verdoppelt sich bei ihrer optimalen Wachstumstemperatur von 100°C in nur 37 min. Durch die Fermentation komplexer organischer Substrate zu H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> gewinnt *P. furiosus* Energie für sein Wachstum. Bereits im Jahre 1986 wurde *P. furiosus* als flagelliert beschrieben (Fiala und Stetter, 1986), wobei mehr als 50 Flagellen einem Zellpol (Abb. 1-2) entspringen.



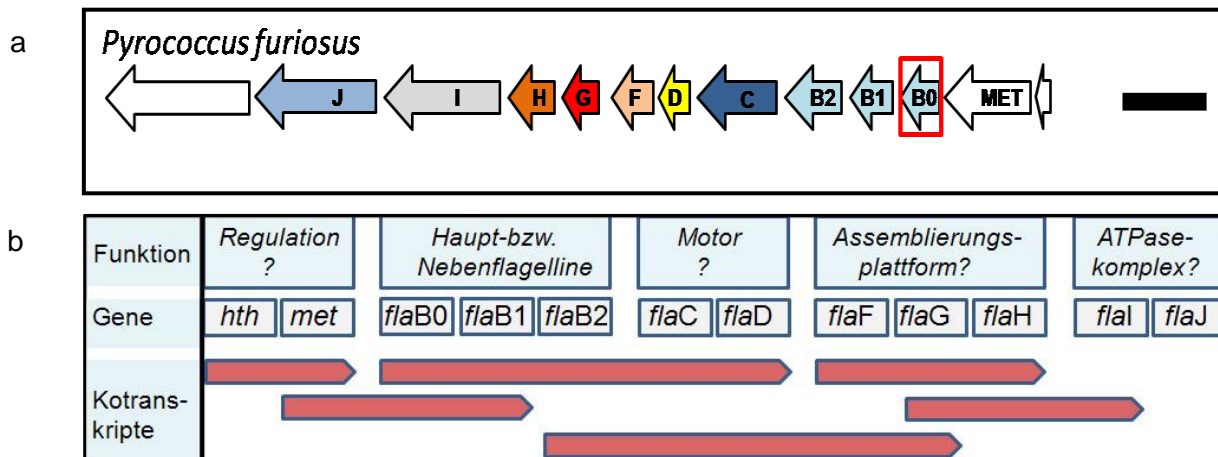
**Abbildung 1-2: Darstellung der Flagellen von *P. furiosus* im Elektronenmikroskop.** Sich teilende Zelle mit polar inserierenden Flagellen (a); vergrößerter Ausschnitt der Insertionsstelle (b); Größenstandard 500 nm, Kontrastierung mit Uranylacetat (UAc).

### 1.2.1 Eine Betrachtung auf Genebene

Mit der Verfügbarkeit des Genoms von *P. furiosus* (Robb et al., 2001) wurde auch die Identifikation des *fla*-Genlokus möglich. Durch intensive Studien am *fla*-Operon von *P. furiosus* stellte sich jedoch heraus, dass der Genlokus teilweise fehlerhaft sequenziert worden war. Ein bis dahin unbekanntes Gen, stromaufwärts von *flaB1* und *flaB2* gelegen, wurde nachträglich identifiziert und als „*flaB0*“ bezeichnet. Außerdem war die in der Datenbank hinterlegte Sequenz für das Strukturgen *flaB1* im N-terminalen Bereich unvollständig, welcher auch das Signalpeptid beinhaltet (Näther, 2007). Eine korrigierte Karte des Operons, das im Genom (Gesamtgröße 1,9 Mbp) auf dem revers komplementären Strang innerhalb der Positionen 344142 bis 353759 kodiert wird, ist in Abb. 1-3 a dargestellt. Stromabwärts der Flagellengene *flaB0* bis *flaB2* liegt der komplette Satz an *fla*-assoziierten Genen vor. Das Gen für die Signalpeptidase (*flaK*) liegt nicht innerhalb des Operons, sondern andernorts in Genom, wie es auch für Vertreter der Gattung *Methanococcus* beschrieben worden ist (Bardy und Jarrell, 2003). Stromaufwärts wird das *fla*-Operon von den Genen *met* (kodiert für eine potentielle Methyltransferase) und *hth* (kodiert für ein Protein mit helix-turn-helix motif) flankiert, denen eine potentiell regulatorische Funktion zugesprochen wird.



Durch die Analyse von cDNA, die aus dem Gesamt-RNA-Pool revers transkribiert worden war, konnten Kotranskripte innerhalb des Operons identifiziert werden. Diese variieren in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, da die Bausteine der Flagelle während des Wachstums vermutlich in unterschiedlichen Mengen benötigt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Zusammenfassung aller *fla*-Gene von *P. furiosus* mit ihren bekannten bzw. potentiellen Funktionen und den gefundenen allgemeinen Kotranskripten ist in Abb. 1-3 b dargestellt.



**Abbildung 1-3: Darstellung des *fla*-Operons von *P. furiosus*.** a: Karte der *fla*-Gene. Das neuidentifizierte Gen *flaB0* ist rot markiert; Größenstandard 1 kb. b: Übersicht über die (potentielle) Funktion der *fla*-Gene und die gefundenen Kotranskripte innerhalb des Operons (aus Näther, 2007, modifiziert).

### 1.2.2 Eine Betrachtung auf Proteinebene

Sowohl über Westernblot, als auch über massenspektrometrische Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine FlaB0, FlaB1 und FlaB2 Bestandteile der Flagellen von *P. furiosus* sind (Näther, 2007; Zach, 2009). Die Verteilung der Flagelline im Filament ist noch unklar, jedoch sprechen die Daten für FlaB0 und FlaB2 als Hauptflagelline. Sicher ist, dass die Untereinheiten in einer linksgängigen Helix mit einer Ganghöhe von 4,4 nm angeordnet sind und dass ein zentraler Hohlraum zum Transport der Untereinheiten fehlt (Näther, 2007). Aus diesem Grund wird für die Flagellen von *P. furiosus*, wie auch für andere archaeelle Flagellen, eine Assemblierung von der Basis her postuliert. Ähnlich wie bei anderen flagellierten Archaeen liegen die Flagelline in glykosilierter Form vor. Ihr Molekulargewicht ist dabei nahezu identisch und beträgt in etwa 30 kDa.

### 1.2.3 Eine Betrachtung auf funktioneller Ebene

Seinen Namen „rasende Feuerkugel“ verdankt *P. furiosus* seiner schnellen Schwimmbewegung mit Hilfe der Flagellen. Mit einer Maximalgeschwindigkeit von 156  $\mu\text{m/s}$  schwimmt der Organismus mehr als doppelt so schnell wie *E. coli*, wobei die Motilität jedoch stark von der Temperatur abhängig ist (Herzog, 2009). Die Agilität der Zellen erreicht bei einer Temperatur von 95°C ihr Maximum, bei der mehr als 90 % der Zellen in Bewegung sind. Neben der Lokomotion sind die Flagellen an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, den sogenannten „cable-like structures“, beteiligt. Dabei handelt es sich um Flagellenbündel, die jeweils einer Kokke entspringen und eine weitere umschließen. Diese hochgeordneten Bündel aus parallelen Flagellen haben einen Durchmesser von ca. 200 nm bei variierender Länge. Über die Funktion der Zell-Zell-Verbindungen ist im Moment nichts bekannt. Es wurde vermutet, dass es sich dabei um Strukturen zum Transfer von DNA handelt (Näther et al., 2006). Interessanterweise wurden Zell-Zell-Kontakte kürzlich auch bei *Methanocaldococcus villosus*, einem methanogenen Archaeum mit über 50 polar inserierenden Flagellen, entdeckt (Bellack et al., 2010 a). Darüber hinaus besitzen die beiden archaeellen Spezies eine weitere Gemeinsamkeit: Sie nutzen ihre Flagellen, um sich damit an Oberflächen festzuheften (Näther et al., 2006; Schopf, 2006; Bellack et al., 2010 a). Bemerkenswert ist, dass die Organismen die Fähigkeit haben, zwischen den angebotenen Oberflächen zu selektieren. So gibt es neben Materialien, die hervorragend bewachsen werden andere, beispielsweise Glas oder Holz, die nicht oder nur spärlich besiedelt werden (Näther et al., 2006; Schopf, 2006). Auf glasartigem Kohlenstoff („Glaskohle“) bildet *P. furiosus* Mikrokolonien, wobei die Zellen untereinander und mit der Oberfläche durch ein dichtes Netzwerk aus Flagellen verbunden sind. Absolut neuartig war die Entdeckung, dass *P. furiosus* die Flagellen nicht nur zur Adhäsion an Oberflächen und zur Kontaktaufnahme mit arteigenen Individuen, sondern auch zu der mit artfremden einsetzt. Diese Art flagellenvermittelter Interaktion wurde in einer im Labor etablierten Bi-Spezies-Lebensgemeinschaft aus *P. furiosus* und *Methanopyrus kandleri* entdeckt und später auch in weiteren Cokulturen mit methanogenen Partnern, unter anderem auch mit *M. villosus*, beobachtet (Schopf et. al., 2008; Weiner, 2010). Der erfolgreichen Etablierung der archaeellen Cokulturen lag vermutlich eine  $\text{H}_2$ -Syntrophie zwischen den heterotrophen und methanogenen Individuen zu Grunde, die auch in natürlichen Habitaten als Basis von Lebensgemeinschaften postuliert wird.

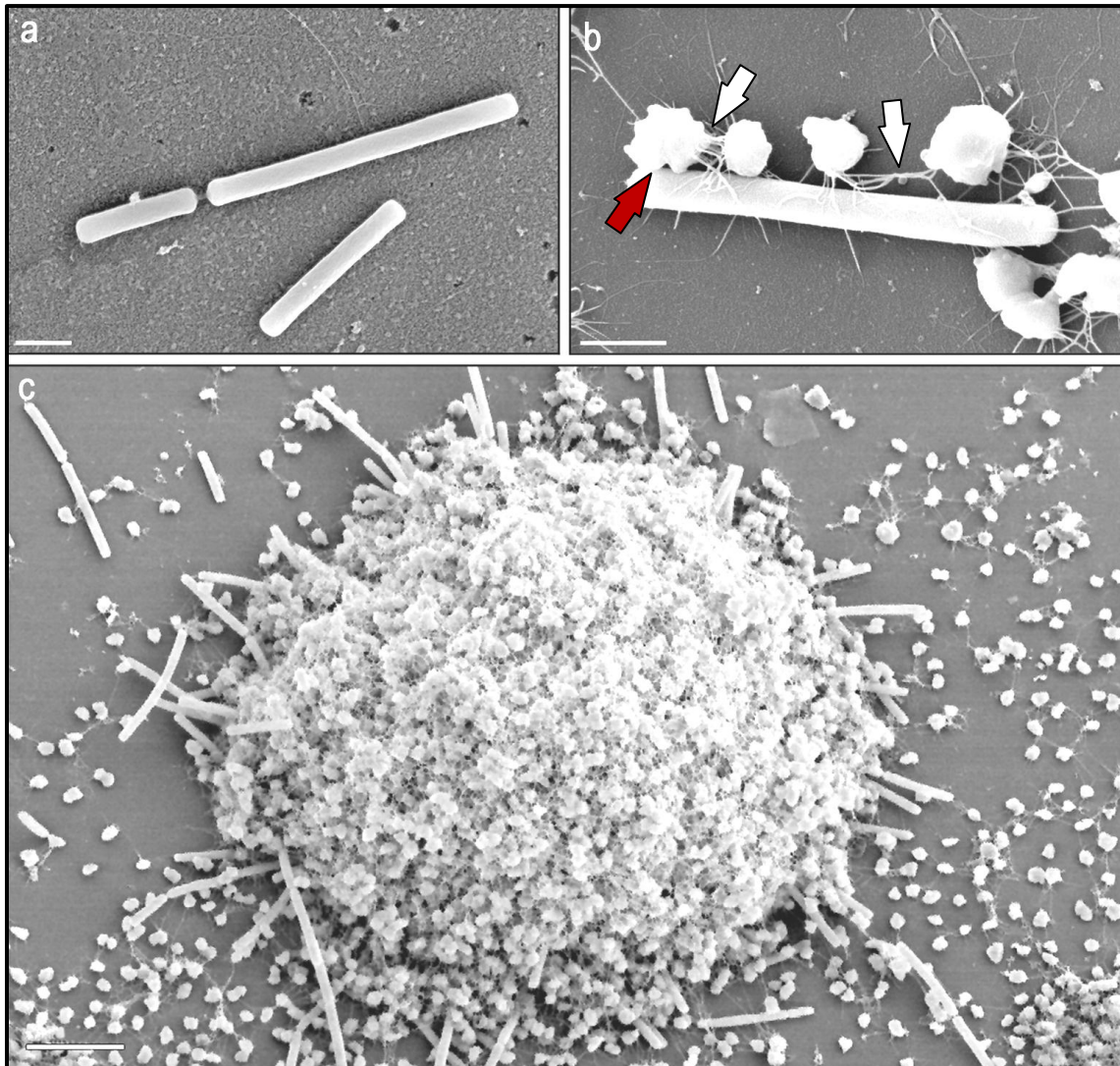


### 1.3 Cokulturen auf der Basis einer H<sub>2</sub>-Syntrophie

Die Ökologie anaerober Hochtemperaturhabitate ist in der Gesamtheit zwar noch relativ unerforscht, jedoch ist bekannt, dass diese Lebensräume sich durch eine hohe Umsatzrate von molekularem Wasserstoff auszeichnen (Adams, 1990). Es gibt Grund zu der Annahme, dass die Vergesellschaftung von Mikroorganismen auf der Basis eines H<sub>2</sub>-Transfers in solchen Habitaten eine wichtige Rolle spielt. Denkbar wäre, dass heterotrophe Organismen in Konsortien mit Methanogenen leben, um das für sie toxische Stoffwechselendprodukt H<sub>2</sub> direkt an die Verwerter weiterzugeben. Diese Art mutualistischer Konsortien ist sogar als Vorstufe zu mehrzelligen Lebewesen proklamiert worden (Johnson et al., 2005). Durch die erfolgreiche Etablierung hyperthermophiler Cokulturen aus methanogenen Archaeen und heterotrophen Bakterien im Labor wurde die Hypothese einer H<sub>2</sub>-getriebenen Interaktion im natürlichen Ökosystem unterstützt (Bonch-Osmolovskaya und Stetter, 1991; Johnson et al., 2005). In einer Cokultur bestehend aus *Thermotoga maritima* und *Methanocaldococcus jannaschii* wurden mutualistische Interaktionen zwischen beiden Organismen nachgewiesen, die sich bei *Thermotoga* in einer um den Faktor zehn erhöhten Zellzahl gegenüber einer Reinkultur unter vergleichbaren Bedingungen äußerte (Muralidharan et al., 1997). Außerdem wurden bei *Thermotoga* viele ABC-Zuckersporter verstärkt exprimiert, was mit der Bildung von Exopolysacchariden (EPS) einherging. Die daraus resultierende Aggregation der Zellen wurde als notwendige Voraussetzung für optimalen interspezies H<sub>2</sub>-Transfer angesehen (Johnson et al., 2005).

Wie bereits oben erwähnt, gelang auf der Basis einer H<sub>2</sub>-Syntrophie auch die Etablierung rein archaeeller Cokulturen (Schopf, 2006; Schopf et al., 2008; Weiner, 2010). Der Vorteil in der Cokultur zwischen *P. furiosus* und *M. kandleri* lag darin, dass letzterer schon allein aufgrund seiner Morphologie (Stäbchen mit einer Länge von bis zu 10 µm) gut von *P. furiosus* (Kokke mit einem Durchmesser von ca. 1 µm) unterschieden werden konnte. Dass die Wechselwirkungen, die beide Organismen aufeinander ausübten, positiver Natur waren, zeigte sich im vermehrten Wachstum der Zellen in Cokultur in Vergleich zu den entsprechenden Reinkulturen. *P. furiosus* profitierte von einer Entgiftungsreaktion, indem er das produzierte H<sub>2</sub> direkt an *M. kandleri* weitergeben konnte, der es zur Energiegewinnung durch Methanogenese benötigte. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen zeigten, dass die Organismen auf festen Oberflächen in strukturierten Bi-Spezies-Biofilmen wuchsen, wobei *M. kandleri* als Primärbesiedler die Adhäsion von *P. furiosus* ermöglichte. So befanden sich die *M. kandleri*-Zellen an der Basis und wurden von einer Vielzahl an Kokken bewachsen, was den Zellaggregaten aufgrund ihres Aussehens den Namen „Spiegelei-Kolonien“ verlieh (Abb. 1-4 c). Die Organismen produzierten EPS, das die Kolonien vermutlich zusammenhielt (Daten nicht gezeigt). Innerhalb dieser Kolonien waren die Flagellen von *P. furiosus* maßgeblich an der Oberflächenadhäsion und an der Ausbildung flagellenvermittelter Zell-Zell-Kontakte beteiligt.

Allerdings konnten auch direkte Zell-Zell-Kontakte zwischen *P. furiosus* und *M. kandleri* beobachtet werden (roter Pfeil, Abb. 1-4 b). *M. kandleri* besitzt Zellanhänge, bei denen es sich aufgrund ihrer Dicke um Fimbrien handeln könnte, mit denen er sich an die Unterlage festheftet (Abb. 1-4 a; Schopf et al., 2008). Inwieweit diese eine Rolle bei der Kontaktaufnahme zu *P. furiosus* spielten, ist momentan jedoch unklar.



**Abbildung 1-4: Archaeelle Cokultur aus *P. furiosus* und *M. kandleri*.** a: Darstellung dünner Zellanhänge bei adhärenenden *M. kandleri*-Zellen; b: flagellenvermittelte Interaktionen (weiße Pfeile) in der Cokultur und Zell-Zell-Kontakte zwischen *P. furiosus* und *M. kandleri* (roter Pfeil); Größenstandard jeweils 1 µm; c: Spiegeleikolonie auf Glaskohle; Detektion über REM; Größenstandard 10 µm (aus Schopf et al., 2008, modifiziert).

Seit kurzem ist bekannt, dass *P. furiosus* Cokulturen mit vier weiteren methanproduzierenden Archaeen eingehen kann, die alle der Familie der *Methanocaldococcaceae* angehören (Weiner, 2010). In den daraus resultierenden vier verschiedenen Bi-Spezies-Lebensgemeinschaften spielen Flagellen eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Partner.

In einer Cokultur aus *P. furiosus* und *M. villosus* standen die Zellen in einem engen Kontakt, der durch ein Netzwerk aus Flagellen erzielt wurde und sowohl in der Flüssigphase, als auch auf einer festen Oberfläche aufrecht erhalten wurde. Dies könnte eine Voraussetzung für den optimalen Austausch von  $H_2$  sein (Weiner, 2010). Interessanterweise wurden in den etablierten Cokulturen auch neutrale und sogar negative Interaktionen zwischen den Partnern beobachtet. In der Lebensgemeinschaft aus *P. furiosus* und *Methanotorris igneus* wurde letzterer in seinem Wachstum gehemmt, so dass es zum Absterben der Zellen kam. Interessanterweise war *M. igneus* der einzig verwendete Vertreter in dieser Studie, der als wenig flagelliert beschrieben worden war (Burggraf et al., 1990). Dieses Kriterium unterschied ihn von den anderen Organismen, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass das Vorhandensein von Flagellen eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreichen  $H_2$ -Symbiose ist.

### 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die  $H_2$ -Syntrophie zwischen *P. furiosus* und *M. kandleri* in der Cokultur genauer untersucht werden. Dazu sollte der  $H_2$ -Gehalt in der Gasphase variiert und der Einfluss auf die Organismen analysiert werden. Des Weiteren sollte die zeitliche Entwicklung der Biofilmbildung, sowie die Verteilung der Organismen im Biofilm untersucht werden. Letzteres sollte anhand spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper bewerkstelligt werden. In einem zweiten Projekt sollten weitere Daten über die Flagellen von *P. furiosus* gewonnen werden. Dies betraf in erster Linie die Lokalisation der Flagelline im Filament, sowie eine Analyse der Verankerungsstrukturen. Zu diesem Zweck standen Antikörper gegen die einzelnen Flagelline zur Verfügung, die gegen die rekombinanten Proteine, bzw. Teilbereiche derer generiert worden waren. Mit diesen sollten Immunlokalisationsexperimenten durchgeführt werden. Zur Analyse der Flagellen und potentieller Verankerungsstrukturen sollte eine Methode etabliert werden, mit der die Zellanhänge intakt und in möglichst hoher Reinheit isoliert werden konnten. Des Weiteren sollte aufgeklärt werden, durch welche Behandlung die Flagellen vollständig in ihre Untereinheiten zerlegt werden können, und ob anschließend eine Repolymerisation der Monomere zum Filament möglich ist. Dazu sollten verschiedene Versuchsparameter, wie Temperatur, Inkubationsdauer und der Einfluss zweiwertiger Ionen berücksichtigt werden. Polymerisationsstudien sollten sowohl mit Monomeren aus nativen Flagellen, als auch mit rekombinanten Flagellinen durchgeführt und ein Vergleich gezogen werden. Aus diesem Grund sollten die optimalen Bedingungen für die Expression von rekombinantem FlaB0 in *E. coli* ermittelt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, Transkripte im *fla*-Operon, die bereits über Reverse Transkription und PCR nachgewiesen worden sind, über Northern Blot Experimente semiquantitativ zu bestimmen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Substanzen und Bezugsquellen

#### 2.1.1 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Agarose HR-Plus	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
AlexaFluor® N-hydroxy Succinimidylester	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calcofluor (Fluoreszenz Brightener 28)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Cäsiumchlorid	Biomol GmbH, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI)	Applichem GmbH, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
n-Dodecyl-beta-D-Maltopyranosid (DDM)	Anatrace, Maumee (USA)
Epsilon-Aminocapronsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol p.a.	Mallinckrodt Barker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glutardialdehyd	Agar Scientific Ltd., Stansted, UK
Glycerin	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Imidazol	Biomol GmbH, Mannheim
Isopropyl-beta-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Magermilchpulver	Michwerke Regensburg eG, Regensburg
4-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Natriumsulfid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Phenol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Phenolgemische	Biomol GmbH, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Piperazin-N,N'-bis-2-Ethansulfonsäure (PIPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Resazurin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase ZAP®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sarkosyl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tricin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	USB Europe GmbH, Staufien
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Uranylacetat	Fluka, Buchs (CH)
Wasser für die Chromatographie LiChrosolv	Merck KGaA, Darmstadt

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von der Firma VWR International GmbH, Darmstadt, bezogen. Alle für die Kultivierung benötigten Gase stammen von der Firma Linde Gas, Nürnberg.

### 2.1.2 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Frankfurt
DNase, RNase-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<i>Nde</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Proteinase K	VWR International GmbH, Darmstadt
Reverse Transkriptase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase A	New England Biolabs, Frankfurt
RNase, DNase-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>Sma</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt



### 2.1.3 Vektoren

<b>Vektor</b>	<b>Bezugsquelle</b>
pET14b	Novagen, Madison (USA)
pET15b	Novagen, Madison (USA)
PTYB2	New England Biolabs, Frankfurt

### 2.1.4 Antikörper

Alle Primärantikörper sind, bis auf gekennzeichnete Ausnahmen, polyklonal und wurden in Zusammenarbeit mit Davids Biotechnologie hergestellt. Die verwendeten Sekundärantikörper sind kommerziell erhältlich.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Literatur</b>	<b>erzeugt in</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-FlaB0-MT	Mittelteil von FlaB0	Näther, 2007	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Anti-FlaB1-MT	Mittelteil von FlaB1	Näther, 2007	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Anti-FlaB2-MT	Mittelteil von FlaB2	Wimmer, 2007	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Anti-FlaB2-CT	C-Terminus von FlaB2	Wimmer, 2007	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Anti-Fla Pfu	Flagellen von <i>P. furiosus</i>	Näther, 2007	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Anti-Pfu OP	Oberflächenproteine von <i>P. furiosus</i>	diese Arbeit	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Anti-Mka OP	Oberflächenproteine von <i>M. kandleri</i>	diese Arbeit	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Anit-His <sub>6</sub> *	His <sub>6</sub> -Tag		Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Übersicht über die Primärantikörper; \*monoklonal.

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Detektion</b>	<b>erzeugt in</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-Mouse IgG + Peroxidase	Maus-IgG	Chemilumineszenz	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-Rabbit IgG + Peroxidase	Kaninchen-IgG	Chemilumineszenz	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-Rabbit IgG + AlexaFluor® 488	Kaninchen-IgG	Fluoreszenz	Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-Rabbit IgG + 6 nm bzw. 10 nm Goldpartikel	Kaninchen-IgG	TEM	Ziege	Aurion Co., Wageningen (NL)

### 2.1.5 Molekularmassenstandards

<b>Größenmarker</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
HMW Calibration Kit for Native Gel Electrophoresis	Protein	GE Healthcare GmbH, München
Protein Marker, Broad Range	Protein	New England Biolabs, Frankfurt
Prestained Protein Marker, Broad Range	Protein	New England Biolabs, Frankfurt
Page Ruler™, Prestained Protein Ladder	Protein	Fermentas, St. Leon Rot
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Protein	Fermentas, St. Leon Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready to use	DNA	Fermentas, St. Leon Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready to use	DNA	Fermentas, St. Leon Rot
λ DNA HindIII + ΦX174 DNA HaeIII digests	DNA	New England Biolabs, Frankfurt
Ribo Ruler™ RNA Ladder, High Range	RNA	Fermentas, St. Leon Rot

### 2.1.6 Antibiotika

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Ampicillin	50-100 µg/ml	MP Biomedicals, Eschwege
Carbenicillin	bis zu 500 µg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloramphenicol	34 µg/ml	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Die Stammlösungen der Antibiotika wurden mit H<sub>2</sub>Omillipore oder Ethanol p.a. hergestellt, steriltfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

## 2.1.7 Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5'-3'	Verwendung
8 aF	TCYGGTTGATCCTGCC	S; archaeell
345 aF	CGGGGYGCASCAGGCGCGAA	S; archaeell
1406 uR	ACGGGCGGTGTGTRCAA	S; universell
B0_pET14b_f	GCAGCC <u>CATATGG</u> CTGTCCGAATGGG	K; ( <i>NdeI</i> )*
B0_pET14b_r	GCAGCC <u>GATCCT</u> CACTGTAGTTCTATGA	K; ( <i>Bam</i> HI)*
Hth_f	GTGCCACCAATAATCGACC	NH; SH
Hth_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGCAACTTTCTTTCCATATTCAGA	NH; SH
Meth_f	ATGGAAAACTAGAGAAGACCGT	NH; SH
Meth_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGCCTAATCCCCGAATTTACTT	NH; SH
FlaB0_f	GAACCTTATAGTGTAT	NH; SH
FlaB0_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGTCACTGTAGTTCTATG	NH; SH
FlaB1_f	GTGAGGAAGGGAGCAATAGG	NH; SH
FlaB1_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGCACATTATACTCAAATGTTGGG	NH; SH
FlaB2_f	TGGATATTTGCAGGAGAAGG	NH; SH
FlaB2_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGTGTAGAGGGAGTTGTGAAGTG	NH; SH
FlaC_f	ATGCCACTCGACTTCCTTTCA	NH; SH
FlaC_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGTCACACCTCCGCAAGAAC	NH; SH
FlaD_f	GGATTCCTTAACCCCTAGACAA	NH; SH
FlaD_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGTGCAAACCTTAGGAGTTGGTA	NH; SH
FlaF_f	GTATGCAGCATGGGACAGTG	NH; SH
FlaF_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGTCAGTCCACCTCCGTTGG	NH; SH
FlaG_f	AGTACGGTTGCTGGAAGCATT	NH; SH
FlaG_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGCTCTTCTTCCCATTCTTAGAA	NH; SH
FlaH_f	GCAAGCTATGTTTCAGCCAAT	NH; SH
FlaH_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGTCACACGACTGCAGCAATCT	NH; SH
FlaI_f	CACTTGAAGATGCCATGAGAAG	NH; SH
FlaI_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGTGAATGGGATTATTGCATTTAA	NH; SH
FlaJ_f	GGCAGACATAGACCCCAAAG	NH; SH
FlaJ_r_T7	TAATACGACTCACTATAGGGAACTTCTAATGAATGCTGGAA	NH; SH

K: Klonierung, die Erkennungsstelle des \*Restriktionsenzym ist in der Sequenz unterstrichen; NH: Northern Hybridisierung; S: Sequenzierung von 16S rRNA mit archaeellen oder universellen Primern; SH: Southern Hybridisierung; f: Vorwärtsprimer; r: Rückwärtsprimer.

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion GmbH, Martinsried, bezogen.



### 2.1.8 Reaktionskits

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
DIG Northern Starter Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fast Start High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MinElute® PCR Purification Kit 50	Qiagen, Hilden
peqGOLD Plasmid Minipräp Kit I	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phusion™ High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs, Frankfurt
Protino® Ni-TED 2000	Macherey-Nagel GmbH, Düren
QIAEX® II Gel Extraction Kit 150	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit 50	Qiagen, Hilden
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### 2.1.9 Verbrauchsgegenstände

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aerosolfilter Pipettenspitzen	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Aluminiumkappe (Ø 20 mm)	WICOM GmbH, Heppenheim
Dialysesschläuche ZelluTrans® (MWCO: 8-10 oder 12-14 kDa)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DryEase™ Mini Cellophane	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Einmalkanülen	Terumo Europe N.V., Leuven (B)
Einmalskalpelle	VWR International GmbH, Darmstadt
Einmalspritzen 1 ml	Terumo Europe N.V., Leuven (B)
Einmalspritzen 5 ml, 10 ml, 20 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegpasteurpipette (2,5 ml, weite Öffnung)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Falcon Tube™ Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Faltenfilter Whatman 3 MM	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Goldnetzchen für Elektronenmikroskopie (G200, G400)	Plano GmbH, Wetzlar
Gummistopfen	Deutsch & Neumann GmbH, Berlin
Hybond™-N+ Nylon-Membran	GE Healthcare GmbH, München

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Immersionsöl	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kondensatorküvetten	Biorad Laboratories GmbH, München
Kupfernetzchen für Elektronenmikroskopie (G200, G400, Hex600, G100 x 400)	Plano GmbH, Wetzlar
Objektträger	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Parafilm M Laboratory Film	American National Can™, Chicago (USA)
PCR-Cups (0,2 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
pH-Indikatorpapier	VWR International GmbH, Darmstadt
Plastikpetrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml), RNase-frei	Eppendorf AG, Hamburg
Roti®-PVDF Membran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rundfilter (Ø 110 mm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Schraubdeckelgefäße (1,7 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterilfilter (0,22 µm Porenweite)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Whatman 3 MM Chr Papier	Whatman Biometra GmbH, Göttingen

### 2.1.10 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anaerobenkammer	COY Laboratory Products Inc., Ann Arbor (USA)
BioDoc-It™ Imaging System	Ultra Violet Products Ltd., Cambridge (UK)
Blockthermostat Thermomixer Compact 5350	Eppendorf AG, Hamburg
Dispensette	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Dry-Ease™ Gel Trocknungssystem	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gelelektrophoresekammer Model 45-2020i	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
GS Genelinker UV Chamber	Biorad Laboratories GmbH, München
Gelkammer für Agarosegelelektrophorese (11 x 12 cm)	Mechanische Werkstatt Biologie, Universität Regensburg
Hybridisierungsöfen Hybaid Minioven	MWG Biotech. AG, Ebersberg
Elektroporationsapparatur Genenpulser® II	Biorad Laboratories GmbH, München
Inkubatoren Heraeus Typ T6 und Typ B12	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Lichtmikroskop Nikon Labophot 2	Nikon GmbH, Düsseldorf
Minigel-Twin-Apparatur	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler	Biorad Laboratories GmbH, München
Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim

<b>Gerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Rollerdrum™, Model TC7	New Brunswick Scientific Co., Edison (USA)
SANOclav	Wolf SANOclav, Geislingen
Spektralphotometer Genesys 5	Milton Roy Europe, Pont Saint Pierre (F)
Sterilbank Microflow Biological Safety Cabinet	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Thomazählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Biorad Laboratories GmbH, München
Ultraschall Desintegrator Sonifier 250	Branson Ultrasonic Corp., Danbury
Ultraturrax T 25	IKA Werke, Staufen
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia (USA)
Waage MC1-Analytic AC 120 S	Santorius AG, Göttingen
Waage Precision Standard TP400D	Ohaus Corp., Cambirdge (UK)
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbadschüttler Gryotory Model G76	New Brunswick Scientific Co., Edison (USA)
<b>Zentrifugen:</b>	
Biofuge 13 (Rotor 3757)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Centrifuge 5402 (Rotor F45-18-11)	Eppendorf AG, Hamburg
Labofuge GL (Rotor 2150)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Sorvall RC 5C Plus (Rotoren GSA, GS3, SS34)	DuPont, Connecticut (USA)
Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vakuumzentrifuge DNAmmini	Heto-Holten, Allerød (DK)

### 2.1.11 Materialien für Aufwuchsversuche

<b>Material</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aluminiumfolie	Al-Gehalt mind. 99 %; nicht bis schwach legiertes Aluminium	diverse
Deckglas/Süsse	Borsilikatglas der 1. hydrolytischen Klasse; DIN ISO 8255-1	Süsse Labortechnik, Gudensberg
Deckglas/Knittel	Borsilikatglas der 1. hydrolytischen Klasse; DIN ISO 8255-1	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs-GmbH, Braunschweig
Deckglas/Marienfeld 24 x 24 mm	Borsilikatglas der 1. hydrolytischen Klasse; DIN ISO 8255-1	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Deckglas/Marienfeld 24 x 40 mm	Borsilikatglas der 1. hydrolytischen Klasse; DIN ISO 8255-1	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Deckglas/Menzel	Borsilikatglas der 1. hydrolytischen Klasse; DIN ISO 8255-1	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig

<b>Material</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Emaile	23 % Borax, 52 % Feldspat, 5 % Flussspat, 5 % Quarz, 5 % Soda, 2,5 % Natriumnitrat, je 0,5 bis 1,5 % Cobalt-, Mangan- und Nickeloxid, 6,5 % Kryolith; 6-10 % Trübungsmittel und Farboxide	Materialprobestück, Pfaudler Werke GmbH, Schwetzingen
Gold	Au-Netzchen für Elektronenmikroskopie	Plano GmbH, Wetzlar
Nickel	Ni-Netzchen für Elektronenmikroskopie	Plano GmbH, Wetzlar
Objektträger ELKA	Borsilikatglas der 1. hydrolytischen Klasse; DIN ISO 8255-1	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim
PC	Synthetisches Polymer	Makrolon®; Bayer AG, Leverkusen
Plexiglas	Polymethylmethacrylat; synthetischer thermoplastischer Kunststoff	Mechanische Werkstatt Biologie, Universität Regensburg
PTFE	Polytetrafluorethylen	Mechanische Werkstatt Biologie, Universität Regensburg
PVC	Polyvinylchlorid; amorpher thermoplastischer Kunststoff	Mechanische Werkstatt Biologie, Universität Regensburg
Serumflaschenglas	Borsilikat der 1. hydrolytischen Klasse; DIN ISO 8255	Pharmapack Stute, Rheinbreitenbach
Silizium Wafer	polykristallines Silizium	Infineon Technologies AG, Regensburg

## 2.2 Kulturmedien

### 2.2.1 Herstellung aerober Medien

Alle benötigten Salze und organischen Komponenten wurden in einem ausreichend großen Glasgefäß eingewogen, in welchem ein Teilvolumen des benötigten  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  vorgelegt worden war. Nach dem Lösen aller Substanzen wurde der pH-Wert kontrolliert und ggf. auf einen neutralen Wert eingestellt, bevor auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt wurde. Das Medium wurde je nach Versuchsansatz in Erlenmeyer-Kolben oder Reagenzgläser umgefüllt und autoklaviert (siehe 2.5). Zur Herstellung von Platten wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5 % Agar (w/v) versetzt. Die Platten wurden nach dem Abkühlen des Agars auf ca. 55°C gegossen. Bei dieser Temperatur konnte dem Medium auch ein Antibiotikum aus einer sterilen Stammlösung zugegeben werden (siehe 2.1.6), um Selektivbedingungen zu schaffen.

### 2.2.2 Luria-Bertani (LB) Medium für *E. coli*

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Pepton	5,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 1000 ml

### 2.2.3 SOB-Medium

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Trypton	10 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	0,25 g
KCl-Lösung (250 mM)	2,5 mM
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 500 ml

Das SOB-Medium wurde zur Anzucht von *E. coli*-Zellen verwendet, die chemisch kompetent gemacht werden sollten (siehe 2.12.3). Alle festen Bestandteile des Mediums wurden zuerst in ca. 450 ml H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gelöst, bevor die KCl-Lösung zugeben wurde. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,5 eingestellt. Vor der Verwendung wurde das Medium durch Zugabe 10 mM MgCl<sub>2</sub> (w/v; Endkonzentration) aus einer sterilen Stammlösung komplettiert.

### 2.2.4 Herstellung anaerober Medien

Für die Herstellung anaerober Medien wurden alle Salze und organischen Komponenten eingewogen und in einer Schottflasche (Schott AG, Mainz) in ca. 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gelöst. Nach der Zugabe von Kaliumjodid und Resazurin wurde die Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> auf das Endvolumen aufgefüllt. Bei Großansätzen konnte das Medium anschließend in 1 l Druckflaschen aus Borsilikatglas (Müller & Krempel, Bülach, CH) überführt werden, welche zu maximal 500 ml befüllt und mit Metalldeckeln sicher verschlossen wurden. Anschließend wurde das Medium 20 min unter Druckausgleich mit N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) durchgast, um den Sauerstoff auszutreiben. Verbleibender Restsauerstoff wurde durch die Zugabe von gelöstem Na<sub>2</sub>S reduziert, was am Farbumschlag des Mediums von rosa nach farblos verfolgt werden konnte. Der pH-Wert wurde überprüft und gegebenenfalls eingestellt, bevor das Medium in der Anaerobenkammer zu je 20 ml in 120 ml Serumflaschen aus Natronsilikatglas (Pharmapack Stute, Rheinbreitenbach) abgefüllt wurde. Dieser Schritt wurde bei einer Kultivierung in 1 l Druckflaschen übersprungen. Die Serumflaschen wurden mit Gummistopfen luftdicht verschlossen, die mit Aluminiumkappen ge-

sichert wurden. Der Austausch des Formiorgases  $N_2/H_2$  (95:5, v/v) erfolgte an der Gasstation durch dreimaliges Evakuieren und Aufpressen des gewünschten Gasgemisches mit einem Überdruck von 1,2 bar (Serumflaschen) bzw. 0,8 bar (Druckflaschen). Anschließend wurde das fertig abgefüllte Medium autoklaviert.

### 2.2.5 SME-Medium für *P. furiosus*, *M. kandleri* und die Cokultur

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
NaCl	27,7 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	7,0 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	5,5 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,75 g
KCl	0,65 g
NaBr	0,1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,03 g
SrCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,015 g
KJ-Lösung, 0,2 % (w/v)	0,25 µl
Resazurin, 0,1 % (w/v)	0,5 ml
Na <sub>2</sub> S x 3 H <sub>2</sub> O	0,25 g
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 1000 ml

Das von Stetter et al. (1983) als "SME" beschriebene Medium wurde bei der Herstellung mit 0,1 % Hefeextrakt (w/v) und 0,1 % Pepton (w/v) supplementiert. Der pH-Wert von 6,5 wurde mit 1 M NaOH eingestellt. Im Fall von *P. furiosus* wurde  $N_2/CO_2$  (80:20, v/v) und von *M. kandleri*  $H_2/CO_2$  (80:20, v/v) als Gasphase verwendet. Für die Cokultur aus *P. furiosus* und *M. kandleri* wurde ein  $N_2/H_2/CO_2$ -Gemisch (Zusammensetzung variabel, für Standardkultivierung jedoch 65:15:20, v/v/v) aufgepresst.

### 2.3 Verwendete Organismen

<b>Organismus</b>	<b>Genotyp/Anmerkung zum Stamm</b>	<b>Lagerung*</b>	<b>Literatur</b>
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ <sup>-</sup> ; Klonierungsstamm	BB LRW	Taylor et al., 1993
<i>Escherichia coli</i> ER2566	F- λ- fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr- 73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]; Expressionsstamm	BB LRW	www. neb.com
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)pLysS (Cam <sup>R</sup> ); Expressionsstamm	BB LRW	Studier und Moffatt, 1986
<i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> ); Expressionsstamm	BB LRW	Studier und Moffatt, 1986
<i>Pyrococcus</i> <i>furiosus</i> Vc 1 Typstamm	als Typstamm Vc1 (DMS 3638) bezeichnet, jedoch NICHT mit diesem identisch, da er vor der Sicherung bereits 3-5 Jahre im Umlauf war	BBR 19/12/3	Fiala und Stetter, 1986
<i>Pyrococcus</i> <i>furiosus</i> Laborstamm	über mehrere Jahre laufende Kultur im LRW	KR LRW	Fiala und Stetter, 1986
<i>Methanopyrus</i> <i>kandleri</i> AV 19	Typstamm AV 19 (DMS 6324)	BBR 10//7/1	Kurr et al., 1991
Cokultur <i>P. furiosus</i> Laborstamm/ <i>M.</i> <i>kandleri</i> AV 19	Cokultur aus hyperthermophilen Archaeen; etabliert im Rahmen einer Diplomarbeit	KR LRW	Schopf, 2006; Schopf et al., 2008

**\*Erläuterungen zur Lagerung:** BB LRW: Bakterienbank Labor Reinhard Wirth, Lagerung über flüssigem N<sub>2</sub>; BBR: Bakterienbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Lagerung über flüssigem N<sub>2</sub>; KR LRW: Kühlraum Labor Reinhard Wirth; Lagerung bei 8°C.

## 2.4 Kultivierung

### 2.4.1 Wachstumsbedingungen der Organismen

<b>Organismus</b>	<b>Medium+Zusätze*</b>	<b>Gasphase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>pH-Wert</b>
<i>E. coli</i> DH5α	LB	aerob	37°C	7,0
<i>E. coli</i> ER2566	LB	aerob	37°C	7,0
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	LB + Cam (34 µg/ml) +1 % Glukose	aerob	37°C	7,0
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE	LB + Cam (34 µg/ml)	aerob	37°C	7,0
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS	LB + Cam (34 µg/ml)	aerob	37°C	7,0
<i>P. furiosus</i> Vc 1 Typstamm oder <i>P. furiosus</i> Laborstamm	SME + 0,1 % YE + 0,1 % Pepton	N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80:20, v/v)	95°C	6,5
<i>M. kandleri</i> AV 19	SME + 0,1 % YE + 0,1 % Pepton	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80:20, v/v)	95°C	6,5
Cokultur <i>P. furiosus</i> Labor- stamm/ <i>M. kandleri</i> AV 19	SME + 0,1 % YE + 0,1 % Pepton	N <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> variabel	95°C	6,5

\*Erläuterung zu den Zusätzen: Cam: Chloramphenicol; YE: Hefeextrakt.

### 2.4.2 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

*E. coli*-Stämme wurden unter aeroben Bedingungen als Flüssigkulturen angezogen oder auf Agarplatten ausgestrichen. Die für die Flüssigkulturen verwendeten Kulturgefäße wurden maximal bis zu 20 % ihres Volumens mit Medium befüllt, mit einer Einzelkolonie als Inokulum beimpft und mit luftdurchlässigen Stopfen verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C üN im Rollerdrum bzw. Wasserbadschüttler (Flüssigkulturen) oder Wärmeschrank (Agarplatten).

### 2.4.3 Kleinanzuchten von *P. furiosus*, *M. kandleri* und der Cokultur

Die Anzucht von *P. furiosus*, *M. kandleri* oder der Cokultur *P. furiosus*/*M. kandleri* im Kleinmaßstab erfolgte im Heißluftinkubator bei 95°C. 20 ml Ansätze wurden 1/100, 500 ml Ansätze 1/500 aus einer logarithmisch wachsenden Vorkultur angeimpft und die Serum- bzw. Druckflaschen liegend und unter Schütteln bei ca. 50 Upm inkubiert. In der Regel wurden die Zellen üN für ca. 16 h bebrütet.



### 2.4.4 Anzucht von Organismen auf festen Oberflächen

Zur Analyse des Adhäsionsverhaltens von Organismen auf Oberflächen wurden verschiedene Materialien (siehe 2.1.11) auf eine Größe von ca. 0,5 x 1,0 cm zurechtgeschnitten und in Serumflaschen vorgelegt. Anschließend wurden die Serumflaschen mit Medium befüllt, autoklaviert und 1/100 mit einer logarithmisch wachsenden Vorkultur angeimpft. Die Inkubation der Zellen erfolgte üN wie bereits beschrieben (siehe 2.4.3). Bei gutem Bewuchs der Kulturmedien (mind.  $3 \times 10^7$  Zellen/ml) wurde das Material aus den Serumflaschen ausgeschüttelt. Zum Entfernen nicht adhärierender Zellen wurde das Material kurz in SME-Waschmedium (Rezept nach 2.2.5, jedoch ohne Hefeextrakt und Pepton) gewaschen. Opake Materialien konnten über Durchlichtmikroskopie auf Bewuchs hin untersucht werden. Bei lichtundurchlässigen Materialien wurden Zellen mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen markiert (siehe 2.7).

### 2.4.5 Anlegen von Glycerinkulturen

Aerobe Kulturen, z.B. „positive“ *E. coli*-Klone, konnten durch Einlegen in Glycerin dauerkonserviert werden. Dazu wurden 10 ml stationär gewachsene Kultur geerntet (5000 Upm, 15 min, Labofuge GL) und in 0,5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Schraubdeckelgefäß überführt, das 0,5 ml steriles 99,5 %iges Glycerin p.a. (v/v) enthielt. Die Kultur wurde bei -20°C gelagert und galt nach einem positiven Regenerationsversuch als dauerkonserviert.

## 2.5 Sterilisation

Nährmedien, Puffer und Lösungen wurden für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck bei feuchter Hitze im Autoklaven sterilisiert, wobei Glycerin und DMSO eine Ausnahme bildeten (1 h, 100°C). Plastik- und Glaswaren, sowie H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> wurden für 40 min bei 121°C, Zentrifugenbecher aus Polypropylen (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK) für 15 min bei 100°C autoklaviert. Glaspipetten wurden für 4 h bei 160°C unter trockener Hitze gebacken. Hitzeempfindliche Substanzen, wie z.B. Zuckerlösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm). Alle für RNA-Arbeiten benötigten Lösungen und Gefäße wurden gesondert sterilisiert (siehe 2.8.1).

## 2.6 Mikroskopie

### 2.6.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Die lichtmikroskopische Kontrolle von Zellen erfolgte am Nikon Labophot-2 Phasenkontrastmikroskop, das mit einem Ölimmersionsobjektiv (100 x/1,25; Nikon) und drei Luftobjektiven (4 x/0,10/0,25; 10 x/0,25; 40 x/0,65; jeweils Nikon) ausgestattet war. Zur photographischen Dokumentation wurde eine Nikon Coolpix 950 Digitalkamera verwendet.

Die Epifluoreszenzmikroskopie wurde am Olympus BX 50 Phasenkontrastmikroskop mit UV-Ausstattung (UV-Netzgerät U-RFL-T200 und Filter) durchgeführt. Dieses Mikroskop war mit zwei Objektiven (40 x und 100 x; jeweils Olympus) versehen. Folgende Filter standen zur Verfügung:

<i>Verwendung für</i>	<i>Filter</i>	<i>Anregungsfilter</i>	<i>Teilerspiegel</i>	<i>Emissionsfilter</i>
Dapi, Calcofluor	U-MNU2	BP 360-370	DM 400	BA 420
AlexaFluor® 555	F41-003	HQ 546 $\pm$ 6	Q 560 LP	HQ 585 $\pm$ 20
AlexaFluor® 488	F41-054	HQ 480 $\pm$ 20	Q 505 LP	HQ 520 $\pm$ 15

Digitale Bilder und Videos wurden mit der Pixelfly CCD Kamera PCO 1600 (PCO, Kelheim) erstellt. Alle digitalen Aufnahmen wurden mit dem Programm Adobe Photoshop® CS2 nachbearbeitet.

### 2.6.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl einer Kultur wurde mit einer Thomazählkammer (Volumen pro Kleinstquadrat: 0,02 mm x 0,0025 mm<sup>2</sup>) nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gesamtzellzahl/ml} = \text{Anzahl der Zellen/Kleinstquadrat} * 2 * 10^7$$

### 2.6.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden an einem Philips CM 12 Transmissionselektronenmikroskop (Fei Co., Eindhoven, NL) durchgeführt. Die mit einer LaB<sub>6</sub>-Kathode erzeugten Elektronen wurden durch eine Spannung von 120 kV im Hochvakuum beschleunigt. Die Bilddokumentation erfolgte mit einer Slow-Scan CCD Kamera (1k x 1k, TVIPS, Gauting), wobei die Microsoft® Windows gestützte Software EM-Menü 4.0 (TVIPS) verwendet wurde.

### Herstellung von Suspensionspräparaten

Zur Herstellung von Suspensionspräparaten ganzer Zellen wurden ca. 20 ml Kultur für 15 min mit Glutardialdehyd fixiert (EM-grade; 1% Endkonzentration, v/v) und anschließend durch Zentrifugation aufkonzentriert (5000 Upm, 20 min, Labofuge GL). Das Zellpellet wurde in ca. 20 µl Restvolumen resuspendiert. Mit Kohlefilm belegte Kupfernetzchen (400 mesh) wurden im Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-XG (Harrick Scientific Corporation, New York, USA) hydrophiliert und 5 µl der zu untersuchenden Probe aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 s wurde die Probe auf ein Filterpapier geblottet und das Präparat 1-2 Mal mit H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gewaschen. Das Präparate wurde unmittelbar danach negativ kontrastiert, um ein Eintrocknen der Probe zu verhindern.

### Negativkontrastierung

Bei der Negativkontrastierung werden biologische Moleküle vom Kontrastierungsmittel ausgespart, welches sich nur in den Zwischenräumen ansammelt. Somit erscheinen biologische Präparate kontrastärmer als ihre Umgebung. Als Kontrastierungsmittel wurde eine Schwermetallsalzlösung (hier Uranylacetat) verwendet. Dazu wurde das präparierte Trägernetzchen 1 min in einem Tropfen essigsaurer Uranylacetatlösung (2 %, w/v) inkubiert und die Flüssigkeit anschließend auf ein Filterpapier geblottet. Nach Lufttrocknung konnten das fertige Präparat mikroskopiert werden.

### Tomographie

Die Berechnung der räumlichen Struktur von Objekten konnte durch die Aufnahme von Kippserien im TEM bewirkt werden. In dieser Arbeit wurden Tomographien an Suspensionspräparaten vorgenommen, die bereits mit Uranylacetat kontrastiert worden waren. Voraussetzung für eine 3D-Rekonstruktion war dabei die korrekte Alignierung der erhaltenen Einzelaufnahmen, wozu kohlebefilmte Kupfernetzchen (100 x 400 mesh) mit kolloidalem Gold belegt werden mussten, das Fixpunkte in der späteren Datenverarbeitung darstellte. Vor der Applikation der kolloidalen Goldlösung (6 nm oder 10 nm; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) musste diese zuerst mit Ultraschall behandelt werden, um eine homogene Verteilung der Partikel zu gewährleisten (5 Pulse, Duty cycle 20 %, output control 2). Im Anschluss daran wurden 20 µl Goldlösung drei Mal hintereinander auf den hydrophilierten Kohlefilm eines Netzchens aufgetragen und nach 20 s Inkubation auf ein Filterpapier geblottet. Das fertige Präparat wurde in einen Standardpräparatehalter eingespannt, der eine Kippung von ca. -60° bis +60° Kippung erlaubte.

Zur Aufzeichnung einer Kippserie wurde zuerst eine Aufnahme des Präparates beim höchstmöglichen positiven Winkel gemacht, bevor so lange gekippt und aufgezeichnet wurde, bis der höchstmögliche negative Winkel erreicht war. Die Sicherung der Daten erfolgte unter dem Programm EM-Menü 4.0, wo sie zur weiteren Bearbeitung als EM-Format exportiert wurden. Anschließend wurde eine Alignierung der Einzelbilder mit Hilfe des Software-Paketes TOM Toolbox (Nickell et al., 2003) durchgeführt, das auf der linuxgestützten Software MATLAB (The MathWorks, Natick, USA) basiert. Die dreidimensionale Rekonstruktion erfolgte über die sogenannte weighted-back-protection Methode (WBP). Diese wurde im Anschluss daran mit Hilfe des Programms AMIRA (Visage Imaging, Richmond, USA) unter dem Betriebssystem Windows 7 visualisiert.

### 2.6.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

#### ***Fixans-Puffer***

Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat	140 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
NaCl	2,5 g
H <sub>2</sub> Omillipore	ad 100 ml

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,0 eingestellt. Die Haltbarkeit des Fixans-Puffers betrug einen Monat bei 8°C Lagerungstemperatur.

Die gebrauchsfertige Fixanslösung setzte sich aus einem Teil Glutardialdehyd (25 %, v/v, EM-grade) und neun Teilen Fixans-Puffer zusammen und wurde aufgrund ihrer kurzen Haltbarkeit (drei bis vier Tage bei 8°C) erst kurz vor Verwendung hergestellt. Die Präparate wurden vor Ort fixiert und zur weiteren Bearbeitung nach München geschickt. Alle in dieser Arbeit gezeigten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn Prof. Dr. Wanner am Biozentrum der LMU München in Martinsried an einem Hitachi S 4100-Gerät oder Zeiss Auriga erstellt. Die Herstellung und Mikroskopie konventioneller Ultradünnschnitte wurden wie bereits wie beschrieben (Jogler et al., 2011) von Herrn Wanner durchgeführt.

## 2.7 Fluoreszenzfärbungen

### 2.7.1 DAPI-Färbung

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
3 M Na-Acetat, pH-Wert 4,7	200 µl
0,5 M Na <sub>2</sub> -EDTA	100 µl
10 % SDS (w/v)	10 µl
DAPI-Stammlösung (400 µg/ml)	200 µl
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 1000 µl

DAPI interkaliert zwischen AT-Basenpaare in doppelsträngiger DNA und zeigt eine blaue Fluoreszenz bei einem Absorptionsmaximum vom 364 nm. 1-5 µl der DAPI-Gebrauchslösung wurden zur analysierenden Probe pipettiert, die sich auf einem Objektträger befand. Das Präparat konnte anschließend im Epifluoreszenzmikroskop unter Verwendung des DAPI-Filters untersucht werden (siehe 2.6.1).

### 2.7.2 Färbung von Zellen mit AlexaFluor®

Zellen und teilweise auch Zellanhänge konnten mit Fluoreszenzfarbstoffen der AlexaFluor® N-hydroxy Succinimidylester-Reihe markiert werden, wobei die Farbstoffkopplung an primären Aminen von Proteinen, Peptiden oder Aminosäuren erfolgte. Detaillierte Protokolle zur Portionierung und Lagerung der Farbstoffe, sowie zur Färbung an sich, können nachgelesen werden (Thoma, 2005; Schopf, 2006).

### 2.7.3 Kopplung von Antikörpern mit AlexaFluor®

Der Farbstoff konnte an Primärantikörper gekoppelt und so zur spezifischen Detektion von Zellen oder Zellbestandteilen eingesetzt werden. Dazu wurde 1 ml gereinigte Antikörperlösung (siehe 2.19.2) zu 100 µg AlexaFluor®-Farbstoff gegeben. Zur Einstellung eines leicht basischen pH-Wertes wurden 60 µl 1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben und der Ansatz bei RT lichtgeschützt und unter sanftem Schütteln für 1 h inkubiert. Die Abtrennung des überschüssigen Farbstoffes erfolgte durch Verwendung von Microcon CM 30 Ultrazentrifugationssäulchen nach Angaben des Herstellers (Millipore GmbH, Schwalbach). Die fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.8 Isolierung und Analytik von Nukleinsäuren

#### 2.8.1 Allgemeine Hinweise zum Umgang mit RNA

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die normalerweise auch ohne Cofaktoren ihre Funktion ausüben können. Sie kommen ubiquitär vor und zerstören RNA, selbst wenn sie in kleinsten Mengen vorhanden sind. Zu den obligaten Maßnahmen beim Arbeiten mit RNA gehörten das Tragen von Einmalhandschuhen, der Gebrauch RNase-freier Reaktionsgefäße und die Benutzung von Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern. Zur Flächendekontamination wurde das RNase ZAP® Pumpspray verwendet. Alle benötigten Lösungen mussten mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) RNase-frei gemacht werden, welches die Nukleasen durch kovalente Modifikation an Histidinresten inaktivierte. DEPC wurde in einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) eingesetzt und musste üN bei 37°C gelöst werden. Puffer und Lösungen mit DEPC wurden anschließend für 20 min,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  für 40 min bei 121°C autoklaviert, wobei die Chemikalie in die unschädlichen Komponenten  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und Ethanol zerfiel. Glasgefäße und Spatel wurden durch Backen für 4 h bei 250°C dekontaminiert. Plastikware wurde zuerst mit Spülmittel, dann mit 70 %igem Ethanol (v/v) gereinigt. Anschließend wurde die Plastikware für mindestens 10 min in eine 3 %ige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (v/v) eingelegt und vor der Verwendung gründlich mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  gespült.

#### 2.8.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *P. furiosus*

Gesamt-RNA von *P. furiosus* wurde aus zwei verschiedenen Wachstumsphasen isoliert. Dazu wurden jeweils 500 ml exponentiell (ca.  $5 \times 10^7$  Zellen/ml) oder stationär (ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml) gewachsene Kultur geerntet (5000 Upm, 20 min, Sorvall, GS-3 Rotor). Das Pellet wurde zum Aufschluss der Zellen in 1 ml Trizol resuspendiert und die Zellsuspension 10 min bei RT inkubiert. Das Zelllysate wurde mit 0,2 ml Chloroform für 3 min unter sanftem Schwenken ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (12000 Upm, 15 min, 4°C, Centrifuge 5402). Die RNA-enthaltende wässrige Phase wurde abgenommen, mit 0,5 ml eiskaltem Isopropanol versetzt und für 30 min bei -20°C gelagert. Durch erneute Zentrifugation (12000 Upm, 15 min, 4°C, Centrifuge 5402) wurde die RNA pelletiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol (v/v) versetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (7500 Upm, 5 min, 4°C, Centrifuge 5402) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und schließlich in 100 µl  $\text{H}_2\text{O}_{\text{LiChrosolv}}$  gelöst.

Zur Entfernung von DNA-Kontaminationen wurde die Nukleinsäure-Lösung mit 10 µl DNase I und 90 µl *DNase I Incubation Buffer* (aus dem High Pure RNA Isolation Kit) versetzt, 15 min bei RT inkubiert und anschließend über eine Phenol-Chloroform Extraktion weiter aufgereinigt. Dazu wurde die Probe mit 1 Volumenanteil (Vol.) Phenol ausgeschüttelt und zur Phasentrennung

zentrifugiert (13000 Upm, 10 min, 4°C, Centrifuge 5402). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und im zweiten und dritten Extraktionsschritt zuerst mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v), dann mit 1 Vol. Chloroform ausgeschüttelt. Anschließend konnte die RNA gefällt werden (siehe 2.8.4).

### 2.8.3 Isolierung genomischer DNA aus *P. furiosus*

Die Isolierung genomischer DNA wurde nach bereits beschriebener Methode durchgeführt (Wimmer, 2007).

### 2.8.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der peqGOLD Plasmid Minipräp Kit I nach Herstellerangaben verwendet. Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde auf den QIAGEN® Plasmid Maxi Kit zurückgegriffen.

### 2.8.5 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung wurde die genomische DNA bzw. Gesamt-RNA mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetatlösung (pH-Wert 7,5; bei Bedarf RNase-frei) und 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol<sub>absolut</sub> versetzt und für mindestens 1 h auf –20°C gestellt. Danach wurden die Nukleinsäuren pelletiert (14000 Upm, 10 min, 4°C, Centrifuge 5402) und zwei Mal mit je 200 µl eiskaltem Ethanol<sub>absolut</sub> gewaschen (14000 Upm, 10 min, 4°C, Centrifuge 5402). Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Nukleinsäure-Pellet für ca. 15 min bei RT luftgetrocknet und anschließend in einem kleinem Volumen H<sub>2</sub>O<sub>LiChrosolv</sub> resuspendiert. DNA wurde bei -20 °C, RNA bei -80°C gelagert.

### 2.8.6 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren konnten abgeschätzt werden, indem die Stärke einer Bande unbekannter Konzentration auf einem Agarosegel mit der Stärke der Banden des Standards verglichen wurde.

Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen photometrisch mit einem Nanoliter-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), welches die DNA-Konzentration aus der Absorption von Lösungen in einem Bereich von 220 bis 350 nm berechnete. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gab Hinweise auf Kontaminationen der DNA-Lösung mit Proteinen. Bei einem Wert von unter 1,8 war von einer starken Proteinkontamination der Nukleinsäurelösung auszugehen, was eine korrekte Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration störte.

### 2.8.7 Native Agarose-Gelelektrophorese zur Analytik von DNA

#### **TAE-Puffer**

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	1 mM

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte über 0,7-1,0 %ige Agarosegele (w/v). Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde die Agarose mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml versetzt, um die DNA über UV-Licht sichtbar machen zu können. Anschließend wurde die Agarose in eine horizontale Gelapparatur gegossen und mit dem entsprechenden Kamm versehen. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 6 x Loading Dye (Fermentas, St. Leon Rot) versetzt. Zusätzlich wurde ein Molekularmassenstandard aufgetragen (siehe 2.1.5), um die Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente bestimmen zu können. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung von 80 V. Das im Loading Dye enthaltene Bromphenolblau bildete eine Laufront im Gel und zeigte so das Fortschreiten der Elektrophorese an. Das Ergebnis konnte auf einem UV-Schirm ( $\lambda = 322 \text{ nm}$ ) detektiert und mit Hilfe der Bio-Doc-It™ Geldokumentationsanlage fotografiert werden.

### 2.8.8 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur RNA-Analytik

#### **10 x MOPS**

MOPS	200 mM
Na-Acetat	50 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	10 mM

Die Substanzen wurden in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gelöst und der pH-Wert von 7,0 mit 1 M NaOH eingestellt.

Um die Qualität isolierter Gesamt-RNA zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Diese fand durch Zugabe von Formaldehyd unter denaturierenden Bedingungen statt, da einzelsträngige RNA aufgrund intramolekularer Basenpaarbildungen zur Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen neigt und somit nur schwer im nativen Gel aufgetrennt werden kann.

Zur Herstellung 1,2 %iger Gele (w/v) wurden 1,8 g peqGOLD Universal Agarose (RNase-frei) in 142 ml 1 x MOPS gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ca. 60°C wurde ihr Formaldehyd (37 %, v/v) in einer Endkonzentration von 0,8 % (v/v) zugegeben. Das Gel wurde in eine horizontale RNase-freie Elektrophoreseapparatur (11 x 12 cm) gegossen und mit dem entsprechenden Kamm versehen. Jeweils 5 µg Gesamt-RNA sowie 5 µl



RNA-Standard wurden 1:1 mit 2 x RNA Loading Dye (Fermentas, St. Leon Rot) versetzt, für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend sofort für 1 min auf Eis gekühlt. Nach dem Probenauftrag erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 40 V in 1 x MOPS. Da Bromphenolblau im Loading Dye enthalten war, konnte das Fortschreiten der Elektrophorese anhand der Laufront des Farbstoffes kontrolliert werden.

### 2.8.9 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese für Northern Blot

#### **Loading Dye**

Formamid 100 %	250 µl
Formaldehyd 37 % (v/v)	83 µl
10 x MOPS	50 µl
Glycerin 87 % (v/v)	50 µl
Bromphenolblau 2,5 % (w/v)	10 µl
H <sub>2</sub> O <sub>LiChrosolv</sub>	57 µl

Zur Herstellung von 1,2 %igen Gelen (w/v) für einen anschließenden Northern Blot wurde RNase-freie Spezial Agarose HR-Plus verwendet. 2,4 g dieser Agarose wurden in 200 ml 1 x MOPS gelöst, aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit 2 % Formaldehyd (37 %, v/v) versetzt. Das Gel wurde so dünn in eine horizontale, RNase-freie Gelapparatur (11 x 12 cm) gegossen, dass die Taschen das Probenvolumen gerade fassen konnten. 1 µg Gesamt-RNA und 5 µl RNA-Standard wurden mit stets frisch zubereitetem Loading Dye im Verhältnis 1:2 versetzt, für 10 min bei 65°C denaturiert und danach sofort 1 min auf Eis gekühlt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 40 V für mindestens 2 h in 1 x MOPS durchgeführt.

## 2.9 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

### 2.9.1 Durchführung einer PCR

Alle PCR-Ansätze wurden unter der Sterilbank auf Eis mit Aerosolfilter-Pipettenspitzen pipettiert, wobei hochreines Chromatographiewasser LiChrosolv verwendet wurde. Die PCR wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen im Thermocycler (MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler; Biorad, München) durchgeführt.

### 2.9.2 Amplifikation von Genen für anschließende Klonierung

Die Ziel-DNA, die als Insert in einen Vektor integriert werden sollte, wurde mit genspezifischen Primern aus genomischer DNA amplifiziert. Über die Primer konnte das Insert mit Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen versehen werden. Die verwendete *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase garantierte durch ihre 3'→5' Exonukleaseaktivität eine geringe Fehlerrate und zeichnete sich zudem durch eine hohe Spezifität und Prozessivität aus.

<b>Komponente/Konzentration</b>	<b>Volumen</b>
Phusion HF Buffer 5 x	10 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
Primer f (100 pmol/µl)*	1 µl
Primer r (100 pmol/µl)*	1 µl
gDNA (100-200 ng/µl)**	1 µl
High Fidelity DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>LiChrosolv</sub>	ad 50 µl

**Standardreaktionsansatz.** \*über die Primer wurden die Restriktionsschnittstellen am 3' und 5' Ende der proteinkodierenden Sequenz eingefügt (siehe 2.1.7); f: Vorwärtsprimer, r: Rückwärtsprimer; \*\*genomische DNA.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	5 s	35
Annealing	variabel*	30 s	
Extension	72°C	30 s	
Finale Extension	72°C	10 min	1
	8°C	∞	

**Standardprogramm zur Amplifikation von Genen.** \*die optimale Annealingtemperatur wurde über einen Gradienten ermittelt.

### 2.9.3 Kolonie-PCR

Mit der Kolonie-PCR konnte überprüft werden, ob eine Transformante „positiv“ war, d.h. den Vektor mit dem eingebauten Insert aufgenommen hatte. Die Template-DNA wurde durch direktes Überimpfen eines Klon von der Agarplatte in das PCR-Gefäß gewonnen. Derselbe Klon wurde zur Sicherung auf einer selektiven LB-Platte ausgestrichen.

<b>Komponente/Konzentration</b>	<b>Volumen</b>
Mastermix 2 x*	10 µl
Primer f (100 pmol/µl)**	1 µl
Primer r (100 pmol/µl)**	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>LiChrosolv</sub>	ad 20 µl

**Standardreaktionsansatz.** \*Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden); \*\*Primer für das klonierte Gen, f: Vorwärtsprimer, r: Rückwärtsprimer.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	35
Annealing	58°C	30 s	
Extension	72°C	1 min	
Finale Extension	72°C	10 min	1
	8°C	∞	

Standardprogramm für eine Kolonie-PCR.

### 2.9.4 Amplifikation archaeeller 16S rRNA-Gene

<b>Komponenten/Konzentration</b>	<b>Volumen</b>
Mastermix 2 x*	10 µl
Primer 8 aF (25 ng/µl)**	1 µl
Primer 344 uR oder 1406 uR (25 ng/µl)**	1 µl
gDNA (100-200 ng/µl)***	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>LiChrosolv</sub>	ad 20 µl

**Standardreaktionsansatz.** \*Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden); \*\*Zur Amplifikation des 16S-rRNA Gens wurden archaeelle bzw. universelle Primer eingesetzt (siehe 2.1.7); aF: Vorwärtsprimer, uR: Rückwärtsprimer; \*\*\*genomische DNA.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	96°C	30 s	10
Annealing	60°C	30 s	
Extension	72°C	60 s	
Denaturierung	94°C	20 s	25
Annealing	60°C	30 s	
Extension	72°C	60 s	
Finale Extension	72°C	10 min	1
	4°C	∞	

Standardprogramm zur Amplifikation von 16S rRNA Genen.

### 2.9.5 Amplifikation von cDNA für *in vitro*-Transkription

Der erste Schritt in der Generierung DIG-markierter RNA-Sonden (siehe 2.11.1) bestand in der Amplifikation von cDNA-Abschnitten über PCR unter Verwendung des *Fast Start High Fidelity PCR Systems* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Dabei wurden Primer eingesetzt, die spezifisch für die Gene des *fla*-Operons von *P. furiosus* waren (siehe 2.1.7) und im Falle der Rückwärtsprimer zusätzlich mit der Sequenz des T7 RNA-Polymerasepromotors versehen waren. Für jeden Ansatz wurde genomische DNA aus *P. furiosus* als Positivkontrolle und Gesamt-RNA als Negativkontrolle mitgeführt.

<b>Komponente/Konzentration</b>	<b>Volumen</b>
MgCl <sub>2</sub> -Buffer 10 x (18 mM)	5 µl
DMSO	2 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
Primer f (100 pmol/µl)*	0,2 µl
Primer r (100 pmol/µl)*	0,2 µl
cDNA/gDNA (100-200 µg/µl)**	0,5 µl
Polymerase Enzyme Blend (5 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>LiChrosolv</sub>	ad 50 µl

**Standardreaktionsansatz.** \*Primer für Gene des *fla*-Operons, f: Vorwärtsprimer, r: Rückwärtsprimer mit Sequenz für den T7-RNA-Polymerasepromotor (siehe 2.1.7); \*\*genomische DNA als Positivkontrolle.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	35
Annealing	55°C	30 s	
Extension	72°C	1 min	
Final Extension	72°C	7 min	1
	8°C	∞	

Standardprogramm zur Amplifikation von cDNA Fragmenten < 3 kb.

## 2.10 Reverse Transkription

Gesamt-RNA konnte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, wobei der *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet wurde. Dabei wurden Anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> Primer eingesetzt, die spezifisch für Poly(A)<sup>+</sup> RNA sind. Als Negativkontrolle wurde stets ein Ansatz ohne RNA und ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Gesamt-RNA, die möglicherweise nicht transkribiert worden war, konnte durch einen halbstündigen Verdau mit DNase-freier RNase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bei RT aus dem Reaktionsansatz entfernt werden.

<b>Komponente/Konzentration</b>	<b>Volumen</b>
Gesamt-RNA (bis zu 4 µg)	variabel
Anchored-oligo(dT) <sub>18</sub> Primer (50 pmol/µl)	1,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	ad 11,4 µl

**Der Ansatz wurde 10 min bei 65°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren und anschließend sofort auf Eis gekühlt, bevor folgende Komponenten zupipettiert wurden:**

Reaction Buffer 5 x	4,0 µl
Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	2,0 µl
DTT	1,0 µl
Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptase	1,1 µl

**Der Gesamtansatz wurde vorsichtig gemischt und für 30 min bei 50°C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte anschließend durch fünfminütiges Erhitzen auf 85°C. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt.**

Standardansatz zur reversen Transkription von Gesamt-RNA.

## 2.11 Blotting von Nukleinsäuren

Dass bestimmte *fla*-Gene wachstumsphasenabhängig kotranskribiert werden, konnte bereits gezeigt werden (Näther, 2007), eine quantitative Aussage über die vorhandene Transkriptmenge war jedoch nicht vorgenommen worden. Zu diesem Zweck sollte mRNA über Northern Blot immobilisiert und mit RNA-Sonden hybridisiert werden. Die Transkriptmenge sollte über die Stärke der detektierbaren Signale semiquantitativ bestimmt werden.

### 2.11.1 DIG-Markierung von RNA-Sonden

<b>Komponente/Konzentration</b>	<b>Volumen</b>
PCR-Produkt (100-200 ng)*	4 µl
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	ad 10 µl
<b>Folgende Komponenten wurden dem Ansatz auf Eis zupipettiert, dieser gemischt und kurz abzentrifugiert:</b>	
Labeling Mix 5 x	4 µl
Transcription Buffer 5 x	4 µl
T7-RNA Polymerase (20 U/µl)	2 µl
<b>Der Gesamtansatz wurde 1 h bei 42°C inkubiert, bevor das PCR-Produkt durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase I (1 U/µl Endkonzentration) für 15 min bei 37°C verdaut wurde. Anschließend wurde die Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH-Wert 8,0) abgestoppt.</b>	

**Standardreaktionsansatz zum Sondenlabeling.** \*Amplifizierte cDNA (siehe 2.9.5).

DIG-markierte RNA-Sonden wurden über *in vitro* Transkription durch die T7-RNA-Polymerase hergestellt. Die im Labeling-Mix (DIG Northern Starter Kit) enthaltenen Digoxigenin-11-UTP Moleküle wurden dabei zufällig in die RNA eingebaut. Als DNA-Matrize für die T7 RNA-Polymerase dienten über PCR amplifizierte cDNA-Abschnitte (siehe 2.9.5). Alle Arbeitsschritte wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Abschließend wurde die Markierungseffizienz der Sonden über einen Dot-Blot nach Angaben des Herstellers getestet.

### 2.11.2 Durchführung des Northern Blots

<b>20 x SSC</b>	
NaCl	3 M
Na <sub>3</sub> -Citrat x 3H <sub>2</sub> O	300 mM
Der pH-Wert von 7,0 wurde mit 1 M HCl eingestellt.	

Bei der Durchführung des Northern Blots musste auf RNase-freie Bedingungen bei allen Arbeitsschritten geachtet werden (siehe 2.8.1). Zuerst wurde die Gesamt-RNA über ein 1,2 %iges Formaldehyd-Gel (w/v; siehe 2.8.9) aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese drei Mal 20 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Dieser Schritt sollte die Effizienz des Nukleinsäuretransfers auf die Membran steigern. Die Taschen und die Spur mit dem RNA-Größenstandard wurden mit einem Skalpell entfernt, bevor das restliche Gel vermessen und die rechte obere Ecke zur späteren Orientierung abgetrennt wurde. Die Banden des RNA-Größenstandards wurden mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 10  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid aus einer Stammlösung (10 mg/ml, w/v) zu 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  pipettiert. Der Gelstreifen wurde 20 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  bis zum gewünschten Grad der Entfärbung geschüttelt. Der RNA-Größenstandard wurde neben einem fluoreszierenden Lineal als Längenmaßstab in der BioDoc-It™ Geldokumentationsanlage fotografiert. Parallel dazu wurde das restliche Gel 20 min in einer 0,05 M NaOH-Lösung geschwenkt, was der partiellen Hydrolyse großer RNA-Moleküle zur Steigerung der Blottingeffizienz dienen sollte. Anschließend wurde das Gel 45 min in 20 x SSC geschüttelt. Ein Stück positiv geladener Hybond™-N+Nylon Membran wurde auf Gelgröße zu- rechtgeschnitten und vor dem Blot zuerst 5 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ , dann 5 min in 20 x SSC inkubiert. Die Whatman 3 MM Papiere (ebenfalls in Gelgröße) wurden mit 20 x SSC befeuchtet, bevor der Kapillilarblot blasenfrei aufgebaut wurde (Abb. 2-1). Dabei wurde das Gel invertiert, so dass sich die RNA-Seite in direktem Kontakt mit der Membran befand. Der Transfer erfolgte über Nacht in 20 x SSC, wobei eine Whatman Papierbrücke in das Pufferreservoir gelegt wurde.

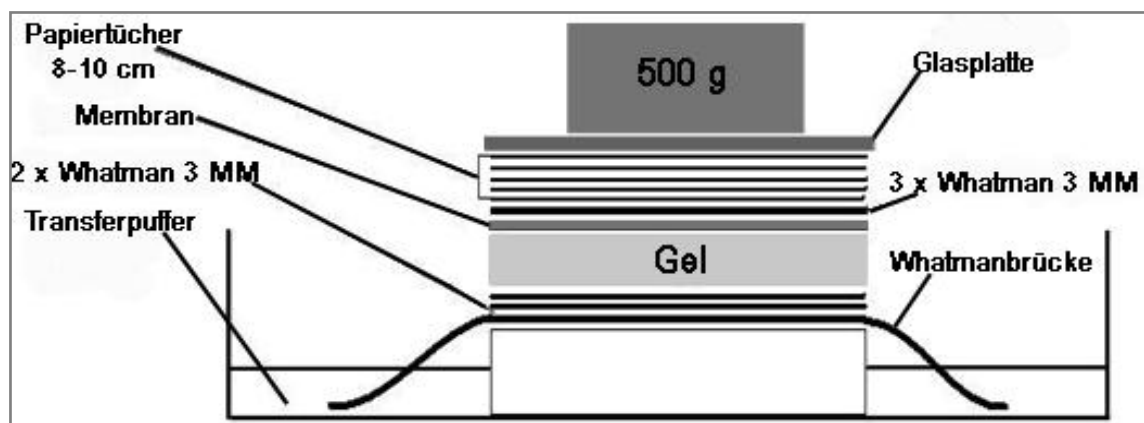


Abbildung 2-1: Schema eines aufwärts gerichteten Kapillarblots.

### 2.11.3 Färbung von Blot-Membranen

#### **Färbelösung**

Methylenblau	0,02 %
Na-Acetat	0,3 M

Der pH-Wert von 5,5 wurde mit 1 M HCl eingestellt.

Um den Erfolg des Nukleinsäuretransfers zu überprüfen, konnten Kontrollspuren von der Membran abgeschnitten und mit Methylenblau schnell und reversibel angefärbt werden. Dieser Farbstoff interkaliert im Gegensatz zu Ethidiumbromid nicht mit Nukleinsäuren und hat somit keinen Einfluss auf die Sensitivität der nachfolgenden Hybridisierung. Der noch feuchte Membranstreifen wurde ohne vorheriges Waschen für 3 min schüttelnd gefärbt und anschließend in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  bei RT entfärbt. Die immobilisierten Nukleinsäuren wurden als dunkelblaue Banden auf einem leicht hellblauen Hintergrund sichtbar. Durch Zugabe von SDS (1 % Endkonzentration, w/v) zum Wasser konnte die Membran vollständig entfärbt werden.

### 2.11.4 Fixierung von Nukleinsäuren auf Blot-Membranen

Nach dem Kapillarblot wurde der Verlauf der Geltaschen, sowie die RNA- bzw. DNA-Seite auf der Membran mit Bleistift markiert. Die Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen (Verdünnung aus 20 x SSC, siehe 2.11.2) und anschließend für 2 h bei 80°C zwischen zwei Whatman 3 MM Papieren gebacken.

### 2.11.5 Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden

<b>Lösung 1</b>	<b>Lösung 2</b>
2 x SSC*	0,1 x SSC
0,1 % SDS (w/v)	0,1 % SDS (w/v)

\*Verdünnung aus 20 x SSC (siehe 2.11.2).

Nach dem Backen zur Fixierung der Nukleinsäuren wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre (Schott AG, Mainz) überführt. Als Hybridisierungstemperatur wurden für eine RNA:RNA-Hybridisierung im Anschluss an einen Northern Blot 68°C eingestellt. Für die Prähybridisierung, die ein unspezifisches Binden der RNA-Sonde an die Membran verhindern sollte, wurden 10 ml entsprechend vorgewärmte Hybridisierungslösung (*Dig Easy Hyb*, DIG Northern Starter Kit) auf die Membran pipettiert. Die Prähybridisierung erfolgte im Hybridisierungssofen unter Rotation für 30 min. Zur Herstellung der Hybridisierungslösung wurde 1 µg der DIG-markierten RNA-Sonde für 5 min bei 99°C denaturiert, sofort auf Eis gekühlt und



schließlich mit 5 ml einer entsprechend vorgewärmten *DIG Easy Hyb* Lösung vermischt. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte üN unter ständigem Rotieren. Vor der Detektion wurde die Membran zuerst zwei Mal in Lösung 1 (je 5 min bei RT) und anschließend zwei Mal in Lösung 2 (je 15 min bei Hybridisierungstemperatur) gewaschen.

### 2.11.6 Detektion über Chemilumineszenz

Über eine chemilumineszente Reaktion konnte die Hybridisierung der DIG-markierten RNA-Sonden mit den Nukleinsäuren auf der Membran sichtbar gemacht werden. Dazu wurden Antikörper verwendet, die mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt waren und Digoxigenin als Antigen erkannten (Anti-DIG Antikörper, DIG Northern Starter Kit). Die Antikörper banden an Digoxigenin, welches an die Uracil-Nukleotide der RNA-Sonden gekoppelt war. Diese Bindung konnte über Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden, die von der Alkalischen Phosphatase in Anwesenheit ihres Substrates CDP-Star produziert wurde. Stammlösungen aller benötigten Puffer konnten dem *DIG Wash- and Block Buffer Set* entnommen und unter RNase-freien Bedingungen verdünnt werden. Alle Arbeitsschritte zur nicht-radioaktiven Detektion der Nukleinsäuren wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Abschließend erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz im LAS-3000 Fluoreszenzimager.

## 2.12 Klonierung

*Escherichia coli* wurde als biologisches System zur Expression rekombinanter Proteine verwendet. Dabei standen verschiedene Vektorsysteme zur Verfügung (siehe 2.1.3), die eine induzierbare Kontrolle des klonierten Gens unter dem starken Promotor des *E. coli* Phagen T7 erlaubten. Alle Expressionsvektoren verfügten über eine Kopie des *lacI* Gens, welches für den Lac-Repressor kodiert. Durch die Bindung des Repressors an die *lac* Operatorsequenz downstream des T7 Promotors wird die basale Expression des klonierten Gens in Abwesenheit von IPTG reprimiert. Als Selektionsmarker dient das Resistenzgen gegen Ampicillin.

Alle verwendeten *E. coli*-Expressionsstämme (siehe 2.3) trugen eine chromosomal integrierte Kopie des T7 RNA-Polymerase Gens unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Auch hier verhinderte die Bindung des Repressors an die T7 RNA-Polymerase die Expression der rekombinanten Proteine, welche erst durch die Zugabe von IPTG zu den Zellen induziert werden konnte. Zur stringenteren Kontrolle der basalen Expression durch die T7 RNA-Polymerase konnten *E. coli*-Stämme verwendet werden, die ein zusätzliches Plasmid (pLysS oder pLysE) trugen. Dieses Plasmid kodiert für T7 Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, und enthält das Resistenzgen gegen Chloramphenicol.

### 2.12.1 Reinigung von PCR-Fragmenten

PCR-Produkte wurden vor der Klonierung von ungebundenen Primern und Nukleotiden gereinigt. Dazu wurde der MinElute® PCR Purification Kit 50 nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) verwendet und die DNA mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{LiChrosolv}}$  eluiert.

### 2.12.2 Restriktionsverdau und Ligation

Der erste Schritt bei der Klonierung bestand darin, den Vektor und das Insert mit Restriktionsenzymen zu schneiden. Abhängig von den verwendeten Restriktionsendonukleasen wurde die Reaktion entweder bei 25°C oder 37°C für 1-3 h (im Falle von *sticky ends*) oder üN (im Falle von *blunt ends*) durchgeführt, wobei auf Herstellerangaben zurückgegriffen wurde (New England Biolabs, Frankfurt). Die Restriktionsenzyme und abgespaltenen Nukleotide wurden nach Ablauf der Reaktionszeit unter Verwendung des MinElute® PCR Purification Kit 50 entfernt.

Für die nachfolgende Ligation wurden 1-5 U T4 Ligase für bis zu 1 µg DNA verwendet. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:5 bei DNA mit *blunt ends* und 1:2 bei DNA mit *sticky ends*. Die Ligation erfolgte üN bei 16°C. Nach Ablauf der Zeit wurde die T4 Ligase durch zehnmütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert und der Erfolg der Ligation auf einem 0,7 %igen Agarosegel (w/v) überprüft. Zur Reinigung und Reduktion des Salzgehaltes wurde die DNA mit Ethanol aus dem Reaktionsansatz gefällt (siehe 2.8.5).

### 2.12.3 Herstellung kompetenter Zellen

Das ligierte Konstrukt aus Vektor und Insert wurde zur Replikation in Bakterienzellen transformiert. Eine Voraussetzung dafür war, dass die bakteriellen Zellen kompetent, d.h. bereit zur Aufnahme von Fremd-DNA waren.

#### Elektrokompetente Zellen

4-5 ml *E. coli*-Vorkultur wurden als Inokulum für 250 ml (bedarfsweise selektives) LB-Medium verwendet. Die Kultur wurde bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4-0,6 im Wasserbadschüttler inkubiert und unter sterilen Bedingungen geerntet (6000 Upm, 15 min, 4°C, Sorvall, GS3-Rotor). Anschließend wurden die Zellen durch abwechselnde Resuspensions- und Zentrifugationsschritte (6000 Upm, je 15 min, 4°C) in einem stetig geringer werdenden Volumen sterilem 10 %igem Glycerin (v/v) aufgenommen (250 ml, 100 ml, 50 ml, 20 ml und abschließend 2 ml). Dabei wurden alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen und auf Eis durchgeführt und die kompetenten Zellen vorsichtig durch Schütteln resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurde abschließend in 40 µl Aliquots bei -70°C gelagert.

### Chemisch kompetente Zellen

#### ***Transformationspuffer***

MnCl <sub>2</sub>	55 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	250 mM
PIPES-Stammlösung (100 mM)	10 mM
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 100 ml

Die Salze wurden in ca. 70 ml H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gelöst, PIPES aus der Stammlösung zugegeben und der pH-Wert mit 1 M KOH auf 6,7 eingestellt. Der Puffer wurde auf das Endvolumen aufgefüllt und sterilfiltriert.

Eine Einzelkolonie eines *E. coli*-Stammes wurde als Inokulum für 20 ml (bedarfsweise selektives) LB-Medium in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben verwendet. Diese Vorkultur wurde üN bei 37°C auf einem Schüttler bebrütet. Je 250 ml SOB-Medium (siehe 2.2.1) wurden separat in zwei 1 l Erlenmeyer-Kolben gefüllt, mit 0,5 ml bzw. 2 ml der Vorkultur angeimpft und bei 20°C schüttelnd bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden 10 min in einem Eiswasserbad gekühlt und anschließend geerntet (4000 Upm, 10 min, 4°C, Sorvall). Die Überstände wurden verworfen und Medienreste vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Die Zellpellets wurden in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer durch leichtes Schütteln resuspendiert, gewaschen (4000 Upm, 10 min, 4°C, Sorvall) und abschließend in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer gelöst. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO wurden die Zellen vorsichtig durch mehrmaliges Schwenken gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in 100 µl Portionen bei -70°C gelagert.

#### 2.12.4 Transformation

##### Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 5 µl Plasmid-DNA gemischt. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis gelagert und in eine gekühlte Kondensatorküvette überführt. Für die Elektroporation wurde die Küvette gut abgetrocknet und in die Pulsapparatur eingesetzt. Der Elektropuls erfolgte bei 2 kV, 800 Ohm und 25 µF. Nach dem Puls wurden die Zellen mit 200 µl kühlem LB-Medium aus der Küvette gespült und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Regenerationsphase von ca. 1 Stunde bei 37°C wurden die transformierten Zellen auf vorgewärmten selektiven LB-Platten in unterschiedlichen Verdünnungen (10 µl, 25 µl, 100 µl, Rest) ausplattiert und üN bei 37°C bebrütet.

### Heatshock

#### **SOC-Medium**

SOB-Medium*	20 ml
Glukoselösung 1 M	20 mM

\*Rezeptur siehe 2.2.3, jedoch ohne Zugabe von  $\text{MgCl}_2$ .

Ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit maximal 5  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA gemischt. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 90 s auf 42°C erhitzt und anschließend sofort 2 min auf Eis gekühlt. Danach wurden 800  $\mu\text{l}$  SOC-Medium zum Transformationsansatz pipettiert und dieser für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf vorgewärmten selektiven LB-Platten ausplattiert. Dazu wurden zuerst 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension auf einer Platte ausgestrichen und der restliche Transformationsansatz kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde teilweise verworfen, so dass ein Rest von ca. 100  $\mu\text{l}$  im Reaktionsgefäß verblieb. Die sedimentierten Zellen wurden im Mediumrest durch Schütteln resuspendiert und vollständig auf eine selektive LB-Platte ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte üN bei 37°C.

#### 2.12.5 Screening von Transformanten

„Positive“ Transformanten, die den Vektor mit integriertem Insert aufgenommen hatten, konnten entweder über eine Kolonie-PCR (siehe 2.9.3) oder die Analyse des Restriktionsmusters der Plasmid-DNA identifiziert werden. Bei Anwendung der zuletzt genannten Methode musste zuerst die Plasmid-DNA aus den zu testenden Kolonien extrahiert werden, wobei der peqGOLD Plasmid Minipräp Kit I nach Herstellerangaben (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet wurde. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit den selben Restriktionsendonukleasen verdaut, die für die Klonierung verwendet worden waren (siehe 2.12.2). Aus dem Bandenmuster und der Laufweite der DNA im 0,7 %igen Agarosegel konnte darauf geschlossen werden, ob das Insert integriert worden war. In diesem Fall konnte neben der Bande des linearisierten Vektors zusätzlich eine Bande detektiert werden, die der Größe des Inserts entsprechen musste.

### 2.12.6 DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse

<b>Komponente</b>	<b>Menge bzw. Volumen</b>
Plasmid-DNA oder	800 ng pro Reaktionsansatz oder
PCR-Produkt	100 ng pro 500 bp
Primer (10 pmol/μl)	1 μl
H <sub>2</sub> O <sub>LiChrosolv</sub>	ad 15 μl

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkten wurde von der Firma Entelechon GmbH, Regensburg durchgeführt.

Die Auswertung von Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der windowsgestützten Software BioEdit (Hall, 1999). Ein Sequenzalignment konnte mit dem Programm Clustal W (Thompson et al., 1994) des EBI (*European Bioinformatics Institute*, siehe [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) durchgeführt werden.

### 2.13 Isolierung von Zellkomponenten

#### 2.13.1 Zellaufschluss von *P. furiosus*

<b>TE-Puffer</b>	
Tris	10 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	1,0 mM

Der pH-Wert von 7,5 wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

<b>Lyse-Puffer</b>	
TE-Puffer	75 μl
SDS (1 %, w/v)	10 μl
Lysozym (100 μg/μl)	5 μl
DNase I (30 μg/μl)	5 μl
Sarkosyl (20 μg/μl)	5 μl

20 ml frische üN-Kultur von *P. furiosus* wurden geerntet (5000 Upm, 15 min, Labofuge GL) und die Zellen in 100 μl Lyse-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei -20 °C eingefroren und anschließend für 15 min bei 60 °C im Wasserbad erhitzt. Diese Schritte wurde drei Mal wiederholt. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

### 2.13.2 Zellaufschluss von *M. kandleri*

500 ml frische  $\bar{u}$ N-Kultur wurden geerntet (5000 Upm, 15 min, Sorvall, GS3-Rotor) und das Pellet in 20 ml SME-Medium (Rezept nach 2.2.5, ohne Hefeextrakt und Pepton) resuspendiert. Die Zellen wurden mechanisch unter einer Druckeinwirkung von 6900 kPa in der kleinen Zelle der Frech Press aufgeschlossen.

### 2.13.3 Isolierung der Oberflächenproteine von *M. kandleri*

#### **HEPES-Waschpuffer**

HEPES	10 mM
NaCl	200 mM

Der pH-Wert von 6,8 wurde mit 1 M NaOH eingestellt.

*M. kandleri*-Zellen aus 1 l frischer  $\bar{u}$ N-Kultur wurden pelletiert (8000 Upm, 15 min, Sorvall, GS3-Rotor) und anschließend zwei Mal in je 15 ml HEPES-Waschpuffer gewaschen (6000 Upm, 10 min, Sorvall, SS 34-Rotor). Das Zellpellet wurde in 4 ml HEPES-Waschpuffer aufgenommen und die Suspension zu gleichen Teilen in vier Reaktionsgefäßen aliquotiert. Anschließend wurde SDS aus einer 10 %igen Stammlösung so zugegeben, dass in jedem Ansatz eine andere Endkonzentration vorlag (0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, w/v). Durch einstündige Inkubation wurden die Oberflächenproteine solubilisiert, wobei zwei verschiedenen Temperaturen (RT und 60°C) getestet wurden. Anschließend wurden die Zellen von den löslichen Oberflächenproteinen durch Zentrifugation abgetrennt (13000 Upm, 10 min, Biofuge 13). Alle Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, ihr Volumen in der Vakuumzentrifuge DNAmi auf ca. 500  $\mu$ l eingengt und der Erfolg der Proteinextraktion auf einem 10 %igen SDS-Gel (siehe 2.16.3) überprüft. Die pelletierten Zellen wurden mikroskopisch auf ihre Intaktheit hin untersucht, um eine Verunreinigung der Überstände durch cytosolische Proteine weitestgehend ausschließen zu können. Abschließend wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt (siehe 2.16.1).

### 2.13.4 Präparation des S-Layers von *P. furiosus*

#### **MES-Puffer**

MES	0,523 g
NaCl*	2,77 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,125 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,015 g
H <sub>2</sub> Omillipore	ad 100 ml

Der pH-Wert von 7,0 wurde mit 1 M NaOH eingestellt. \*Die Ionenstärke und der pH-Wert wurden dem verwendeten Kulturmedium angepasst (hier: SME-Medium).

Zellen aus 60–100 ml frischer *üN*-Kultur wurden nach der Ernte (5000 Upm, 15 min, Sorvall, SS 34-Rotor) mit 20 ml MES-Puffer gewaschen (14000 Upm, 10 min, Sorvall, SS 34-Rotor) und das resultierende Zellpellet in 5–10 ml MES-Puffer aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mechanisch über Ultraschall (5 x 1 min bei *Duty cycle* 20 % und *output control* 2), wobei zwischen jedem Puls eine Kühlphase von 1 min eingelegt wurde. Um die Viskosität des Lysats herabzusetzen, wurde die DNA mit DNase I (Endkonzentration 30 µg/ml) für 30 min bei RT verdaut. Die festen Zellbestandteile wurden pelletiert (14000 Upm, 15 min, Sorvall, SS 34-Rotor) und in 2 ml MES-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde mit Triton X-100 aus einer 10 %igen Stammlösung versetzt (Endkonzentration 0,5 %, v/v) und für 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert, um die Membranproteine zu solubilisieren. In zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten (13000 Upm, 15 min, Biofuge 13) wurde das Pellet mit jeweils 2 ml MES-Puffer gewaschen. Abschließend wurde die pelletierte S-Layer Fraktion in wenig MES-Puffer (50–100 µl) aufgenommen. Die S-Layer Fraktion wurde bei –20 °C aufbewahrt.

### 2.14 Präparation der Flagellen von *P. furiosus*

#### 2.14.1 Zelllyse und differentielle Zentrifugation

Nach der Ernte von 1-2 l frischer *üN*-Kultur (8000 Upm, 20 min, 4°C, Sorvall GS3-Rotor) wurde das Zellpellet in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> aufgenommen, gewaschen (17000 Upm, 15 min, 4°C, Sorvall SS 34-Rotor) und die pelletierten Zellen erneut in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit DNase I (Endkonzentration 50 µg/ml, v/v) und PMSF (Endkonzentration 0,1 mM) versetzt, um die Viskosität der Lösung herabzusetzen und die Proteine zu stabilisieren. Zur osmotischen Lyse der Zellen wurde der Reaktionsansatz unter Rühren zuerst 30 min bei RT, anschließend für 1,5-2 h bei 8°C inkubiert. Nach der vollständigen Zelllyse wurde die Suspension in zwei Zentrifugationsschritten von größeren Zelltrümmern befreit (4500 Upm und 7500 Upm, jeweils 15 min, 4°C, Sorvall, SS 34-Rotor). Der Überstand wurde abschließend bei ca. 125000 x g zentrifugiert (42000 Upm, 1 h, 4°C, Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, 70.1 Ti-Rotor). Der resultierende leicht bräunliche Überstand wurde bei 8°C für die Analytik auf einem SDS-Gel aufbewahrt (siehe 2.16.3) und das Pellet sofort weiter verarbeitet.

### 2.14.2 Solubilisierung der Membranproteine

#### **Membranpuffer**

HEPES	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

Der pH-Wert von 7,0 wurde mit 1 M NaOH eingestellt.

#### **Solubilisierungspuffer**

Membranpuffer	10 ml
DDM	0,05 g

Die Solubilisierung der Membranproteine und das Herauslösen der Flagellen aus ihrer Verankerung wurde mit dem nicht ionischen Detergenz DDM (n-Dodecyl-beta-D-Maltopyranosid, Endkonzentration 0,5 %, w/v) bewirkt. Dazu wurde das schwerlösliche braune Pellet aus 2.14.1 in ca. 9 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert und die Suspension unter Verwendung einer Einwegspritze mit gelber Kanüle vollständig homogenisiert. Die Solubilisierung wurde üN bei RT unter Schütteln durchgeführt. Anschließend wurden die Flagellen bei 125000 x g (42000 Upm, 1 h, 4°C, Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, 70.1 Ti-Rotor) pelletiert und so von den löslichen Proteinen abgetrennt. Das schwerlösliche Pellet wurde in 1 ml Membranpuffer vollständig resuspendiert.

### 2.14.3 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Über isopyknische Dichtegradientenzentrifugation konnten die Bestandteile des resuspendierten Pellets aus 2.14.2 weiter aufgetrennt werden. Zu diesem Zweck wurden 0,45 g/ml CsCl in ein Zentrifugenröhrchen (Ultra Clear™-Röhrchen, 4 ml Volumen, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) eingewogen und in ca. 2,5 ml Membranpuffer sorgfältig gelöst. Das resuspendierte Pellet wurde zugegeben, die Suspension gemischt und das Röhrchen bis knapp unter den Rand mit Membranpuffer aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe bei 250000 x g bis zur Gleichgewichtseinstellung zentrifugiert (48000 Upm, >48 h, 4°C, Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, SW 60-Rotor).



### 2.14.4 Isolierung und Dialyse der Fraktionen

<b>Substanz</b>	<b>Lösung I</b>	<b>Lösung II</b>
NaHCO <sub>3</sub>	0,1 M	-
Na <sub>2</sub> -EDTA	1 mM	-
NaCl	-	0,88 g/l
Na <sub>3</sub> -Citrat	-	0,44 g/l

Die Dialyseschläuche wurden vor ihrer Verwendung in ca. 15 cm lange Stücke geschnitten und in Lösung I für 15 min gekocht. Anschließend wurden die Schläuche sorgfältig mit H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gespült und in Lösung II autoklaviert. Die Schläuche konnten so bei 8°C aufbewahrt werden.

Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurden die durchsichtigen Zentrifugenröhrchen mit einer blauen Kanüle punktiert und die Banden vorsichtig abgezogen. Anschließend wurden die Fraktionen in Dialyseschläuche (MWCO 8-10 kDa) gefüllt und gegen 5 mM HEPES-Puffer (pH-Wert 7,0) zuerst zwei Mal 1 h, sowie ein weiteres Mal üN dialysiert. Alle Fraktionen wurden über SDS-Page (siehe 2.16.3) und Elektronenmikroskopie (siehe 2.6.3) analysiert.

### 2.15 Polymerisationsstudie an Flagellen

#### 2.15.1 Depolymerisation

Zur Zerlegung von Flagellen in ihre Monomere wurden Detergenzien und chaotrope Agentien in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Eine Flagellenpräparation aus 2.14 wurde mit SDS, Triton X-100 (je 0,1 % und 1 % Endkonzentration, w/v), Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid (jeweils 1,5 M, 3 M und 5 M Endkonzentration) für 1 h bei RT inkubiert. Der Grad der Monomerisierung wurde anhand von Elektronenmikroskopie und SDS-PAGE untersucht. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel 15 min bei 100°C in einem Auftragspuffer aufgekocht, der frei von SDS war (siehe 2.16.4). Das Detergenz wurde der Probe erst kurz vor dem Gellauf in einer Endkonzentration von 2 % (w/v) zugesetzt.

#### 2.15.2 Repolymerisation von Monomeren

Der erste Schritt beim Versuch, Flagellenmonomere zum Filament zu repolymerisieren, bestand in einer intensiven Dialyse der Flagellenprobe, um alle denaturierenden Chemikalien zu entfernen. Die Probe wurde rührend bei 8°C gegen 500 ml HEPES-Puffer (5 mM, pH-Wert 7,0) zuerst vier Mal 1 h, dann üN dialysiert. Daraufhin wurde das Dialysat zu gleichen Teilen in vier Schraubdeckelgefäßen aliquotiert und jeder Ansatz bei einer anderen Temperatur (8°C, 37°C, 60°C und 90°C) mit dem Zweck inkubiert, bestmögliche Bedingungen für eine potentielle Repolymerisation zu ermitteln.

Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Ansätze bei 60°C und 90°C mit Chill-out Liquid Wax (Biorad Laboratories GmbH, München) überschichtet. Nach 1, 2 und 6 Tagen wurden Aliquots aus jedem Ansatz zur Analyse entnommen. Eine Variation der Versuchsbedingungen bestand darin, die Ansätze mit ATP (1 mM Endkonzentration, v/v) zu versetzen. Die Gabe von ATP wurde aufgrund dessen schneller Hydrolyse alle 2 bis 4 h wiederholt.

### 2.16 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.16.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde photometrisch aus der Absorption einer Proteinlösung bei 280 nm am NanoDrop ND-100 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt.

#### 2.16.2 TCA-Fällung

Proteine konnten aus Lösungen mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) gefällt werden, um die Proteinkonzentration zu erhöhen. Dazu wurde eine Probe mit 20 %iger TCA (v/v) gemischt und üN bei 8°C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden pelletiert (14000 Upm, 5 min, Centrifuge 5402), in 0,5 %iger TCA (w/v) resuspendiert und die Suspension 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation unter den selben Bedingungen wurde das Präzipitat unter Vortexen in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> resuspendiert.

#### 2.16.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

<b>Substanz</b>	<b>Sammelgel 4,5 %</b>	<b>Trenngel</b>
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	1,2 ml	variabel
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	300 µl	variabel
Sammelgelpuffer*	500 µl	-
Trenngelpuffer**	-	1,5 ml
APS (10 %, w/v)	15 µl	30 µl
TEMED	3,0 µl	5,0 µl

**Rezept zur Herstellung eines Minigels der Größe 9,5 cm x 7,5 cm x 1 mm.** \*Zusammensetzung Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; \*\*Zusammensetzung Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8.

### ***Laufpuffer***

Tris/HCl	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1% (w/v)

**Laufpuffer-System nach (Laemmli, 1970).**

### ***2 x Auftragspuffer***

1 M Tris/HCl pH 7,5	60 mM
Glycerin 87 % (v/v)	ca. 10 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

Die elektrophoretische Auftrennung denaturierter Proteinlösungen erfolgte über SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) die aus Trenngelen mit einer variierenden Acrylamidkonzentration von 8-12,5 % (v/v) hergestellt wurden. Die Bestandteile für ein Trenngel wurden gemischt und nach Zugabe von APS und TEMED sofort in eine vertikale Minigel-Twin-Apparatur gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel von einem 4,5 %igen Sammelgel (v/v) überschichtet und mit dem entsprechenden Kamm versehen.

Vor dem Probenlauf wurde die zu untersuchende Proteinlösung 1:1 mit 2 x Auftragspuffer versetzt und anschließend im Wasserbad bei 100°C für 10 min denaturiert. Der aufgetragene Molekularmassenstandard musste entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet werden. Die Elektrophorese erfolgte zuerst bei 220 V, 10 mA und 250 W für 10 min und anschließend bei 220 V, 27 mA und 250 W für 1 h.

#### 2.16.4 2-Dimensionale SDS-PAGE

### ***Auftragspuffer (für die 1. Dimension)***

1 M Tris/HCl pH 7,5	60 mM
Glycerin 87 % (v/v)	ca. 10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

Über 2-Dimensionale SDS-PAGE sollten Informationen über das Denaturierungsverhalten von Flagellen gewonnen werden. Dabei unterschieden sich die Dimensionen in der Art und Dauer der Denaturierung während der Probenvorbereitung. Für die erste Dimension wurden 12,5 %ige Gele, wie unter 2.16.3 beschrieben, hergestellt. Die Probe wurde vor der Elektrophorese durch Zugabe von SDS in einer Endkonzentration von 1 % (w/v) für 1 h bei RT denaturiert.

Anschließend wurde die Probe zur Erleichterung des Probenauftrags auf das Gel 1:1 mit dem Auftragspuffer für die 1. Dimension versetzt, der Bromphenolblau enthielt, sonst aber frei von Detergenzien und Reduktionsmitteln war. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine (siehe 2.16.3) wurde der entsprechende Gelstreifen ausgeschnitten und für 30 min im Auftragspuffer für die 1. Dimension equilibriert. Eine weitere Spur der ersten Dimension, sowie eine Spur mit einem Molekularmassenstandard wurden ebenfalls ausgeschnitten und zur Bestimmung des Migrationsverhaltens der Proteine silbergefärbt (siehe 2.16.6). Zur Denaturierung der zweiten Dimension wurde der Gelstreifen in ein verschließbares Rollrandröhrchen überführt und der Auftragspuffer durch frischen ersetzt, der mit SDS supplementiert wurde (Endkonzentration 2 %, w/v). Anschließend wurde der Gelstreifen für 10 min bei 100°C im Wasserbad aufgeköcht. Nach der Denaturierung der Proteine wurde der Gelstreifen horizontal zwischen zwei Glasplatten eingespannt und ein 12,5 %iges Trenngel gegossen. Ein Abstandshalter wurde senkrecht neben dem Gelstreifen der ersten Dimension gesetzt, bevor das 4,5 %ige Sammelgel gegossen wurde. Durch den Abstandshalter, der auf gleicher Höhe mit der Unterkante des Gelstreifens der ersten Dimension verlief, wurde eine Geltasche für den Molekularmassenstandard geschaffen. Die Elektrophorese wurde erneut wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 2.16.5 High Resolution Clear Native Electrophoresis (Wittig et al., 2007)

<b>Substanz</b>	<b>Sammelgel 4 %</b>	<b>Trenngel 13 %</b>	<b>Trenngel 5 %</b>
H <sub>2</sub> Omillipore	6,7 ml	-	11,8 ml
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	1,2 ml	5,5 ml	2,1 ml
3 x Nativ-Gelpuffer	4,0 ml	7,0 ml	7,0 ml
Glycerin 50 % (v/v)	-	8,4 ml	-
APS (10 %, w/v)	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Rezept zur Herstellung eines Gels der Größe 20 cm x 20 cm x 1,5 mm.

#### **3 x Nativ-Gelpuffer**

Bis-Tris	150 mM
ε-Aminocapronsäure	1,5 M
Triton X-100	0,05% (v/v)

<b>Laufpuffer</b>	<b>Anodenpuffer pH-Wert 7,0</b>	<b>Kathodenpuffer pH-Wert 7,2</b>
Imidazol/HCl	25 mM	7,5 mM
Tricin		50 mM
DDM	-	0,02 % (w/v)
Deoxycholat	-	0,05% (w/v)

Anoden-und Kathodenpuffer mussten frisch hergestellt werden. Der pH-Wert des Anodenpuffers wurde mit konzentrierter HCl eingestellt, der des Kathodenpuffers durfte nur mit Tricin/Imidazol nachgestellt werden.

### **10 x Probenauftragspuffer**

Glycerin 87 % (v/v)	5 % (w/v)
Ponceau	0,01 % (w/v)

Zur Untersuchung von Proteinkomplexen und deren Oligomerisierungsgrad konnte eine *High Resolution Clear Native* (HRCN) Gelelektrophorese (Wittig et al., 1997) durchgeführt werden, bei der im Gegensatz zur *Blue Native Gelelectrophoresis* (BNG) auf die Zugabe des anionischen Farbstoffes Coomassie Blue G-250 verzichtet wurde. Durch die Bindung von Coomassie erfahren die Proteine eine negative Ladung aufgrund deren sie zur Anode wandern. Die Auftrennung der Proteine bei der BNG erfolgt also infolge der Ladung, so dass sogar stark basische Proteine zur Anode wandern. Um sich diesen Vorteil auch bei der HRCN zu Nutzen zu machen, wurde der Kathodenpuffer durch Zugabe milder, nicht denaturierender Detergenzien modifiziert. Hierbei kamen Natriumdeoxycholat (DOC), ein anionisches Detergenz, und das nicht-ionische n-Dodecyl-beta-D-Maltopyranosid (DDM) zum Einsatz. Durch Micellenbildung mit DOC wurden die Proteine mit einer negativen Ladung versehen, so dass sie im elektrischen Feld zum Pluspol hin migrierten. Zusammen mit DDM konnte eine gesteigerte Löslichkeit der Proteine während der Elektrophorese aufrecht erhalten werden. Um eine bessere Auftrennung der Proteinkomplexe zu erreichen, wurden Gradientengele der Größe 20 cm x 20 cm x 1,5 mm verwendet. Dazu wurden ein 13 %iges und ein 5 %iges Trenngel hergestellt und ein nach oben hin abnehmender kontinuierlicher Gradient mit Hilfe eines Gradientenmischers (mechanische Werkstatt Biologie, Universität Regensburg) erzeugt. Nach der Polymerisation des Gradientengels wurde dieses mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet. Die Proteinlösung wurde vor der Elektrophorese mit Probenauftragspuffer im Verhältnis 9:1 versetzt und die Geltaschen vor der Beladung gründlich gespült. Nach Anschluss der Elektrophoresekammer an ein Wasserkühlsystem (4°C) lief das Gel bei max. 300 V, 50 W und 5 mA/Gel für ca. 16 h (Gelelektrophoresekammer Model 45-2020i, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

## 2.16.6 Färbung von SDS-Gelen

Coomassie-Färbung

<b>Substanz</b>	<b>Färbelösung</b>	<b>Entfärber</b>
Coomassie Brilliant Blue G 250	0,25 % (w/v)	-
Methanol	30 % (v/v)	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)	10 % (v/v)

Über eine Färbung mit Coomassie G 250 konnten Proteine bis zu einer Detektionsgrenze von ca. 400 ng pro Bande im Gel nachgewiesen werden.

Das Gel wurde für 30 min in Färbelösung geschwenkt und darauf folgend unter mehrmaligem Wechsel des Entfärbers bis zum gewünschten Grad entfärbt. Alternativ konnten gefärbte Gele in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> eingelegt werden und in der Mikrowelle auf höchster Stufe unter mehrmaligem Wechsel des Wassers entfärbt werden.

Silberfärbung

<b>Schritt</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Zeit</b>
Fixierung	Methanol	50 % (v/v)	mind. 30 min
	Essigsäure	10 % (v/v)	
Waschen I	Ethanol	50 % (v/v)	10 min
Waschen II	Ethanol	10 % (v/v)	10 min
Blockierung	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,02 % (w/v)	1 min
Waschen III	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>		3 x 20 s
Färbung	AgNO <sub>3</sub>	0,1 % (w/v)	20 min
	Formaldehyd	0,027 % (v/v)	
Waschen IV	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>		2 x 20 s
Entwicklung	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,0 % (w/v)	bis zum gewünschten Entwicklungsgrad
	Formaldehyd	0,018 % (v/v)	
Stoppen	Essigsäure	10 % (v/v)	mind. 15 min

Rezept zur Färbung von Gelen der Größe 9,5 cm x 7,5 cm x 1 mm (siehe 2.16.3).

<b>Schritt</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Zeit</b>
Fixierung	Methanol	50 % (v/v)	90 min
	Essigsäure	12 % (v/v)	
	Formaldehyd	0,1 % (v/v)	
Waschen I	Ethanol	50 % (v/v)	3 x 10 min
Blockierung	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,02 % (w/v)	1 min
Waschen II	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	mind. 400 ml	3 x 1 min
Färbung	AgNO <sub>3</sub>	0,2 % (w/v)	90 min
	Formaldehyd	0,075 % (v/v)	
Waschen III	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	mind. 400 ml	2 x 20 s
Entwicklung	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	9,0 % (w/v)	bis zum gewünschten
	Formaldehyd	0,05 % (v/v)	Entwicklungsgrad
Stoppen	Na <sub>2</sub> -EDTA	1,8 % (w/v)	mind. 15 min

Rezept zur Färbung von Gelen der Größe 20 cm x 20 cm x 1,5 mm (siehe 2.16.5).

Die Silberfärbung (Blum und Beier, 1987) ist ein weiteres Verfahren zur Visualisierung von Proteinbanden nach der elektrophoretischen Auftrennung im Gel. Diese Färbemethode ist in etwa vierzigfach sensitiver einzustufen als eine Proteinfärbung mit Coomassie und zeichnet sich durch eine Nachweisgrenze von 5-10 ng Protein pro Bande im Gel aus.

#### 2.16.7 Aufbewahrung von SDS-Gelen

##### **Geltrocknungslösung**

Ethanol	22 % (v/v)
Glycerin 87 % (v/v)	2 % (v/v)
Isopropanol	1 % (v/v)

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden SDS-Gele für 30 min in Geltrocknungslösung geschwenkt und anschließend nach Angaben des Herstellers zwischen zwei Cellophanfolien eingeschweißt (DryEase™ Mini Cellophane, Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Vorübergehend konnten SDS-Gele in einer 5 %igen Essigsäurelösung (v/v) aufbewahrt werden.

### 2.16.8 Proteinsequenzierung

#### N-terminale Sequenzierung

Zur N-Terminalen Sequenzierung von Proteinen über Edman-Abbau (Allen, 1989) wurden diese in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PDVF-Membran geblottet (2.17.1). Die Banden wurden auf der Membran mit Coomassie angefärbt. Dazu wurde die Membran 10-15 min der Färbelösung, bestehend aus 0,2 % Coomassie Blue R-250 (w/v) in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure (jeweils v/v), geschüttelt. Anschließend wurde so lange entfärbt (50% Methanol und 10% Essigsäure, jeweils v/v) bis blaue Proteinbanden sichtbar wurden, die mit einem Skalpell ausgeschnitten werden konnten. Die weitere Analytik wurde im Labor von Prof. Dr. R. Deutzmann am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Regensburg durchgeführt.

#### In-Gel-Verdau und MALDI-TOF MS/MS

Die Proteinanalytik über MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight*) Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) wurde am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Regensburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Deutzmann an einem 4700 Proteomics Analyzer-MALDI MS/MS-Gerät (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die Proteine wurden zuvor einem tryptischen Verdau unterzogen. Die Vorbereitung der Proben erfolgte dabei wie bereits beschrieben (Zach, 2009).

### 2.16.9 Bioinformatische Analysen

Zum Alignment multipler Aminosäuresequenzen stand das Tool Clustal W zur Verfügung. Eine phylogenetische Zuordnung konnte durch den Vergleich öffentlicher Datenbanken mit dem Blast Tool des NCBI-Servers durchgeführt werden. Zur Bestimmung der molekularen Masse und des isoelektrischen Punktes eines Proteins wurde das Programm ProtParam (Gasteiger et al., 2005) verwendet. Die Vorhersage eines potentiellen Signalpeptides wurde mit dem Programm FlaFind 1.0 (Szabó et al., 2007) durchgeführt, mit dem archaeelle Klasse III-Signalpeptide und Prepilinpeptidase-Schnittstellen identifiziert werden konnten. NetNGlyc 1.0 (Gupta und Brunak, 2002) wurde zur Bestimmung potentiell besetzter N-Glykosilierungsstellen verwendet. Konservierte Domänen konnten mit der Datenbank PFAM 24.0 (Finn et al., 2010) abgeglichen werden. SOSUI (Hirokawa, 1998) und TMHMM 2.0 (Krogh et al., 2001) wurden zur Vorhersage von Transmembrandomänen, PSORTb 3.0 (Yu et al., 2010) zur zellulären Lokalisation von Proteinen genutzt. Dreidimensionale Proteinstrukturen konnten mit Phyre 0.2 (Bennett-Lovsey et al., 2008) vorhergesagt werden.



## 2.17 Blotting von Proteinen

Der Transfer von Proteinen auf eine Membran, auch als Westernblot bezeichnet, erfolgte als Elektroblot im Semi-Dry Verfahren (Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell, Biorad, München).

### 2.17.1 Ein-Puffersystem nach Towbin et al. (1979)

#### ***Towbin-Transferpuffer***

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol p.a.	20 % (v/v)

Der Puffer musste stets frisch hergestellt und eiskalt verwendet werden. Der pH-Wert von 8,0–9,0 ergibt sich.

Vor dem Transfer auf eine Roti®-PVDF Membran wurden die Proteine elektrophoretisch in einem SDS-Gel aufgetrennt, wobei ein Prestained Marker (siehe 2.1.5) als Molekularmassensstandard verwendet wurde. Die Membran wurde auf Gelgröße zurechtgeschnitten und im Vorfeld durch einminütiges Schwenken in Methanol p.a. hydrophilisiert. Sechs Stück Whatman 3 MM-Papiere, ebenfalls in Gelgröße, wurden zusammen mit der Membran für 30 min in eiskaltem Towbin-Transferpuffer geschwenkt. Das Gel hingegen wurde nur 15 min im Puffer equilibriert. Die Whatman 3 MM-Papiere, das Gel und die Membran wurden nach Herstellerangaben blasenfrei in die Blot-Apparatur geschichtet. Der Elektroblot der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer maximalen Stromstärke von 1,5 mA pro cm<sup>2</sup> Gel.

### 2.17.2 Drei-Puffer System nach Kyhse-Anderson (1984)

<b><i>Substanz</i></b>	<b><i>Anodenpuffer I pH-Wert 10,4</i></b>	<b><i>Anodenpuffer II pH-Wert 10,4</i></b>	<b><i>Kathodenpuffer pH-Wert 9,4</i></b>
Tris	300 mM	25 mM	25 mM
Methanol	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
SDS	-	-	0,1 % (w/v)
ε-Aminocapronsäure	-	-	40 mM

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

Das Drei-Puffersystem wurde beim Blotten von Proteinkomplexen eingesetzt, die zuvor über HRCN (siehe 2.16.5) aufgetrennt worden waren. Die Roti®-PDVF Membran (in Gelgröße) wurde durch einminütiges Schwenken in Methanol p.a. hydrophilisiert. Im Anschluss daran wurden 15 Whatman 3 MM-Papiere in Gelgröße, sowie die Membran und das Gel für jeweils 1-2 min in Puffer equilibriert und der Blot blasenfrei in dieser Reihenfolge aufgebaut: sechs Whatman 3 MM-Papiere (in Anodenpuffer I), drei Whatman 3 MM-Papiere (in Anodenpuffer II), Membran

(in Anodenpuffer II), Gel und sechs Whatman 3 MM-Papiere (jeweils in Kathodenpuffer). Der Elektrobplot erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 2 mA pro cm<sup>2</sup> Gel (Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell, Biorad, München).

### 2.17.3 Färbung von PDVF Membranen

<b>Substanz</b>	<b>Färbelösung</b>	<b>Entfärber</b>
Methanol	50 % (v/v)	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G 250	0,2 % (w/v)	-

Proteinbanden konnten auf der Membran durch zehnmünütige Inkubation in Färbelösung angefärbt werden. Anschließend wurde die Membran solange in Entfärber geschüttelt, bis blaue Banden auf hellem Hintergrund sichtbar wurden.

## 2.18 Expression rekombinanter Proteine

### 2.18.1 Proteinexpression im Impact-CN-System

Über den Expressionsvektor PTYB2, der Bestandteil des kommerziell erhältlichen Impact-Systems war (New England Biolabs, Frankfurt), wurde das Zielprotein mit einem durch Thiole spaltbaren Intein-Tag am C-terminalen Ende fusioniert, um das rekombinante Protein anschließend über Affinitäts-Säulenchromatographie aufzureinigen zu können.

10 ml frische üN-Kultur eines erfolgreich transformierten *E. coli*-Expressionsstamms (siehe 2.3) wurden als Inokulum für 100 ml selektives LB-Medium verwendet. Die Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei verschiedenen Temperaturen (15°C, 20°C, 37°C) schüttelnd im 250 ml Erlenmeyerkolben inkubiert und die Proteinexpression anschließend durch Zugabe von 0,4 mM IPTG gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben der induzierten Kultur genommen, um den Erfolg der Genexpression zu überprüfen. Zur zellulären Lokalisation der rekombinanten Proteine wurden drei Fraktionen (Mediumüberstand, lösliche cytosolische Fraktion, unlösliche cytosolische Fraktion) präpariert und über SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

### **Aufschlusspuffer**

HEPES	20 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	0,5 M
NaCl	0,5 M

Nach der Ernte von 10 ml induzierter Kultur (5000 Upm, 15 min, Labofuge GL) wurde der Überstand abgenommen, über TCA-Fällung aufkonzentriert und analysiert. Das Pellet wurde in 2 ml 0,1 M HEPES-Puffer (pH-Wert 7,0) gewaschen (6000 Upm, 10 min, Biofuge 13) und vollständig in 100 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (5 mg/ml Endkonzentration) und DNase I (5 µg/ml Endkonzentration) wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (6000 Upm, 10 min, Biofuge 13) wurde die unlösliche cytosolische Fraktion (=Pellet) von der löslichen cytosolischen Fraktion (= Überstand) abgetrennt. Das Pellet wurde in 500 µl 0,1 M HEPES-Puffer (pH-Wert 7,0) resuspendiert. Zur Analytik auf einem SDS-Gel wurden beide Fraktionen mit SDS-Auftragspuffer (siehe 2.16.3) versetzt.

### 2.18.2 Proteinexpression im pET-System

Über die Klonierung in den Vektoren pET14b oder 15b konnte das Zielgen mit einem N-terminalen His-Tag fusioniert werden, was eine spätere Reinigung des rekombinanten Proteins über Metall-Affinitätschromatographie (Nickel-Säule) ermöglichen würde. Das Konstrukt aus Vektor und Insert wurde zuerst in einen Transformationsstamm (z.B. *E. coli* DH5α) gebracht, um die basale Transkription des Zielgens zu minimieren. Erst anschließend wurde es in einen Expressionsstamm umtransformiert. Zur Stabilisierung des Plasmids im Expressionsstamm wurde das Kulturmedium mit Glukose versetzt. Außerdem wurden Antibiotika in hoher Konzentration zugegeben. 2 ml LB-Medium (plus Carbenicillin 200 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml und Glukose 1 %, jeweils Endkonzentrationen, v/v) wurden mit einer Kolonie des transformierten Expressionsstammes beimpft und die Kultur bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2-0,6 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (13000 Upm, 30 s, Biofuge 13) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml frischem LB-Medium resuspendiert. 100 µl dieser Zellsuspension dienten als Inokulum für 8 ml LB-Medium (plus Carbenicillin 500 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml und Glukose 1 %, jeweils Endkonzentrationen, v/v), wobei die Kultur bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,2-0,6 bei 37°C bebrütet wurde. Nachdem die Zellen erneut pelletiert wurden (5000 Upm, 5 min, Labofuge GL), wurden sie in 10 ml LB-Medium (plus Carbenicillin 500 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml und Glukose 1 %, jeweils Endkonzentrationen, v/v) resuspendiert und in ein frisches Reagenzglas überführt. Die Kultur wurde mit 0,1-1 mM IPTG induziert und bei 30°C unter „sauerstoffreduzierten“ Bedingungen (Verschluss mit einer Alukappe) inkubiert.

Größere Kulturansätze von 1-2 l wurden sowohl unter „sauerstoffreduzierten“ Bedingungen (in einer Schottflasche, die zu 75 % ihres Volumens mit Medium befüllt und mit einem Aludeckel verschlossen worden war), als auch unter aeroben Bedingungen inkubiert. Hierzu wurde die Kultur stark schüttelnd in einem Erlenmeyerkolben bebrütet, der mit einem luftdurchlässigen Stopfen verschlossen und maximal bis zu 20% seines Volumens mit Medium befüllt worden war. Um den Erfolg der Genexpression zu überprüfen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und, wie nach Herstellerangaben beschrieben, die Medium- bzw. lösliche und unlösliche cytoplasmatische Fraktion präpariert. Diese wurden über SDS-PAGE und Westernblot auf ihren Gehalt an rekombinantem Protein hin untersucht.

### 2.19 Immunologische Methoden

#### 2.19.1 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Zelloberflächenproteine

Es sollten Antikörper generiert werden, die ein breit gefächertes Spektrum an Antigenen auf der Zelloberfläche von *P. furiosus* bzw. *M. kandleri* erkennen. Zu diesem Zweck wurden ganze Zellen bzw. isolierte Zelloberflächenproteine einem Kaninchen zur Immunisierung gespritzt. Da Antikörper gegen Flagellen zur Ablösung adhärierender Organismen von der Oberfläche führen können, wurden die Zellen vor der Immunisierung mechanisch geschert. Im Fall von *P. furiosus* wurden 500 ml spät exponentielle Kultur nach der Ernte (5000 Upm, 15 min, Sorvall GSA-Rotor) in 5 ml SME-Waschpuffer (Rezept siehe 2.2.5, jedoch ohne Hefeextrakt und Pepton) resuspendiert. Die Flagellen wurden mit dem Ultraturrax T 25 (IKA Werke, Staufen) bei 13500 Upm für 1 min und 20500 Upm für 10 s abgeschert. Die Intaktheit der Zellen musste mikroskopisch überprüft werden, bevor die gescherten Zellen in zwei aufeinanderfolgenden Schritten in jeweils 5 ml SME-Waschpuffer gewaschen wurden (12000 Upm, 20 min, Sorvall, SS-34 Rotor), um Reste von organischen Komponenten aus dem Kulturmedium zu entfernen. Die Zellenzahl wurde auf einen Wert von  $10^6$ - $10^8$  Zellen/ml eingestellt, bevor ein Kaninchen mit der Zellsuspension immunisiert wurde (Davids Biotechnologie, Burgweinting). Dieser Vorgang wurde wiederholt für die Boosterimmunisierungen. Im Falle von *M. kandleri* wurden Zelloberflächenproteine extrahiert (siehe 2.13.3) und mit einer Konzentration von 300 µg/ml einem Kaninchen als Antigene gespritzt.

### 2.19.2 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

#### **Waschpuffer**

1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	57,7 ml
1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	42,3 ml

Der pH-Wert von 7,0 ergibt sich. Der Puffer wurde auf eine Endkonzentration von 20 mM verdünnt.

Das nach erfolgreicher Immunisierung aus einem Kaninchen gewonnene polyklonale Antiserum enthielt eine Reihe von Serumproteinen (z.B. Albumin) sowie alle Antikörper-Isotypen. Immunglobuline des Typs G (IgGs) konnten spezifisch über Affinitätschromatographie aus dem Antiserum aufgereinigt werden. Dazu wurde eine mit Sepharose gefüllte Säule verwendet, bei der Protein G aus *Streptococcus* fest an die Gelmatrix gebunden war. Das Protein G diente als Ligand, an den die IgGs reversibel über ihren Fc-Teil binden konnten. Vor ihrer Verwendung wurde die Säule zuerst mit 11 Säulenvolumen (SV) Waschpuffer bei einem Durchflussvolumen von 1 ml/min gespült, wobei 1 SV 4 ml entspricht. Das polyklonale Antiserum wurde abzentrifugiert (5000 Upm, 10 min, Labofuge GL) und der Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 9 SV Waschpuffer gespült, bevor die Elution unter sauren Bedingungen in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt wurde: Zuerst wurden 4 x 3 ml Elutionspuffer I (0,1 M Glycin/HCl, pH-Wert 2,7) auf die Säule gepumpt und die Fraktionen separat in Reaktionsgefäßen gesammelt, in welche jeweils 500 µl 1 M Tris/HCl (pH-Wert 7,0) zur Neutralisierung des sauren Eluats vorgelegt worden waren. Im zweiten Elutionsschritt wurden die Immunglobuline mit 2 x 3 ml Elutionspuffer II (0,1 M Glycin/HCl, pH-Wert 2,0) von der Säule eluiert und ebenfalls sofort mit jeweils 500 µl 1 M Tris/HCl (pH-Wert 7,0) neutralisiert. Abschließend wurde die Säule mit 11 SV Waschpuffer gespült und bei 8°C in 70 %igem Ethanol (v/v) gelagert. Die aufgereinigten polyklonalen IgGs wurden in Aliquots von 500 µl bei -70°C aufbewahrt.

### 2.19.3 Absättigung polyklonaler Antikörperlösungen

In dieser Arbeit sollten zwei polyklonale Antiseren hergestellt werden, die gegen Zellwandkomponenten von *P. furiosus* oder *M. kandleri* gerichtet sind. Zur Vermeidung von Kreuzreaktionen, die bei polyklonalen Antikörpern weit verbreitet sind, sollten artunspezifische IgGs aus dem entsprechenden Antikörperpool entfernt werden. Dazu wurde das polyklonale Antiserum mit Zellen der anderen Art „abgesättigt“, die aus 20 ml frischer üN-Kultur gewonnen wurden. Nach der Zellernte (5000 Upm, 15 min, Labofuge GL) wurde das Pellet zuerst in 100 µl SME-Waschpuffer (Rezept siehe 2.2.5, jedoch ohne Hefeextrakt und Pepton) resuspendiert. Die Suspension aus beispielsweise *P. furiosus*-Zellen wurde zu 1 ml Antiserum gegeben, das Antikörper gegen *M. kandleri*-Oberflächenproteine enthielt.

Die Probe wurde für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert, um die Bindung der Antikörper an die Zelloberfläche zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Antiserum abgetrennt (13000 Upm, 5 min, Biofuge 13), wobei dieser Schritt so oft wiederholt wurde, bis die Antikörperlösung zellfrei war. Die abge-sättigten polyklonalen IgGs wurden bei -70°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

### 2.19.4 Immuno-Fluoreszenzmarkierung adhärrierender Zellen

Fluoreszenzmarkierte Antikörper (siehe 2.7.3) konnten zur Detektion adhärrierender Zellen eingesetzt werden. Die Anzucht der Zellen auf Oberflächen erfolgte wie unter 2.4.4 beschrieben, wobei bevorzugt Deckglas und Glaskohle verwendet wurden. Die Materialien wurden mit einigen Tropfen SME-Waschpuffer (Rezept siehe 2.2.5, jedoch ohne Hefeextrakt und Pepton) gewaschen, um nicht adhärrierende Zellen zu entfernen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper zugegeben, die in SME-Waschpuffer 1/1000 oder 1/200 verdünnt worden waren. Zur Bindung der Immunglobuline an die Zellen wurde der Reaktionsansatz 1 h bei 37°C lichtgeschützt unter sanftem Schütteln inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch einen Waschschrift entfernt (s.o.) und die Oberflächen nach kurzer Lufttrocknung im Fluoreszenzmikroskop auf Bewuchs hin analysiert.

### 2.19.5 Immunoblot

#### **TBS-T Puffer**

Tris	0,242 % (w/v)
NaCl	0,8 % (w/v)
Tween 20	0,1 % (v/v)

Der pH-Wert von 7,6 wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

#### **Detektionslösung**

3-Amino-9-Ethylcarbazol	20 mg
Kaliumacetatlösung (20 mM), pH-Wert 5,0	50 ml
Triton X-100 (10 %, v/v)	100 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 µl

Amino-Ethylcarbazol wurde in 1 ml Ethanol<sub>absolut</sub> unter Vortexen gelöst und anschließend zur Kaliumacetatlösung gegeben. Die so entstandene Lösung flockte aus und wurde über einem Faltenfilter geklärt. Das Filtrat wurde lichtgeschützt aufbewahrt und erst kurz vor dem Reaktionsstart mit Triton X-100 und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt.

Der Nachweis von Proteinen auf einer Membran wurde mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt und erfolgte in der Regel in zwei Schritten: Zuerst band ein antigenspezifischer unmarkierter Primärantikörper an das gesuchte Protein. Zur Detektion wurde anschließend ein speziesspezifischer, markierter Sekundärantikörper eingesetzt, welcher an den Primärantikörper band. An den Sekundärantikörper war das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, welches die Umsetzung seines Substrates in ein farbiges Produkt katalysierte. Zu Versuchsbeginn wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen aus Magermilchpulver abgesättigt. Dazu wurde die Membran mindestens 4 h in TBS-T Puffer plus 10 % Magermilch (w/v) inkubiert. Nach einem Pufferwechsel gegen TBS-T plus 3 % Magermilch (w/v) wurde der primäre Antikörper in der gewünschten Verdünnung zugegeben und die Membran mindestens 3 h in dieser Lösung geschüttelt. Die Membran wurde zwei Mal 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend in eine Lösung aus TBS-T plus 3 % Magermilch (w/v) überführt, welche den sekundären Antikörper in einer 1/2000 Verdünnung enthielt. Nach einstündigem Schütteln in der Antikörperlösung wurde die Membran drei Mal 10 min in TBS-T gewaschen, bevor sie mit der Detektionslösung überschichtet wurde. Die Detektion erfolgte solange, bis rötlich-braune Banden auf der Membran sichtbar wurden. Zum Abstoppen dieser Reaktion wurde die Membran drei Mal 10 min in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gewaschen. Zur weiteren Aufbewahrung wurde die Membran lichtgeschützt getrocknet. Alle hier beschriebenen Versuchsschritte wurden bei RT ausgeführt. Während der Versuchsdurchführung durfte die Membran nicht antrocknen.

### 2.19.6 Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie

#### **1 x PBS**

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

Der pH-Wert von 7,4 ergibt sich.

<b>Puffer*</b>	<b>PBS plus</b>	<b>Lagerung</b>
PBS-Glycin	Glycin 0,1 % (w/v)	4°C
PBS-BSA	BSA 0,5 % (w/v)	bei -20°C in 1 ml Aliquots
PBS-Glutardialdehyd	Glutardialdehyd 2 % (v/v)	stets frisch herstellen

\*Alle Puffer wurden aus 1 x PBS hergestellt.

<b>Schritt</b>	<b>Dauer</b>	<b>Substanz</b>
Absättigung vorhandener Aldehyde	5 min	PBS-Glycin
Markierung mit 1°AK*	1 h	Verdünnung (variabel) in PBS-BSA
Waschen	2 x 2 min	PBS-BSA
Markierung mit 2°AK**	1-1,5 h	1/50 Verdünnung in PBS-BSA
Waschen	2 x 2 min	PBS-BSA
Waschen	2 x 2 min	PBS
Vernetzung von Epitop, 1°AK und 2°AK	5 min	PBS-Glutardialdehyd
Waschen	2 x 2 min	PBS
Waschen	2 x 2 min	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>
Kontrastierung	1 min	2 % Uranylacetat (w/v)

\*primärer Antikörper; \*\*sekundärer Antikörper

Auch an elektronenmikroskopischen Präparaten konnten Immunmarkierungen durchgeführt werden, wobei ein antigenspezifischer Primärantikörper und ein speziesspezifischer Sekundärantikörper zum Einsatz kamen. An den Sekundärantikörper waren Goldpartikel mit einem Durchmesser von 6 oder 10 nm gekoppelt, die aufgrund ihrer Elektronenundurchlässigkeit als schwarze Körner auf hellem Hintergrund erscheinen und so die Visualisierung der Antikörperbindung an Zellstrukturen ermöglichten. Immunmarkierungen wurden sowohl an Suspensionspräparaten durchgeführt (siehe 2.6.3), als auch an Zellen, die auf Goldnetzchen aufgewachsen waren (siehe 2.4.4).

Alle Lösungen, mit Ausnahme der Antikörperverdünnungen, wurden tropfenweise auf Parafilm vorgelegt. Die Trägernetzchen wurden mit der Probenseite nach unten in den Lösungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die überschüssige Flüssigkeit auf ein Filterpapier geblottet. Die Antikörperverdünnungen wurden erst unmittelbar vor ihrer Verwendung hergestellt und zentrifugiert (13000 Upm, 3 min, Biofuge 13), um eventuelle Präzipitate zu entfernen.



### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Flagellenvermittelte Interaktionen bei *P. furiosus*

##### 3.1.1 Optimierung der Gasphase für die Cokultur

*P. furiosus* und *M. kandleri* wurden zunächst als Reinkulturen angezogen, wobei verschiedene Medien getestet wurden. In SME-Medium, das mit Hefeextrakt und Pepton supplementiert wurde, konnten beide Organismen erfolgreich kultiviert werden, wenn die für ihr Wachstum optimale Gasphase ( $N_2/CO_2$  im Verhältnis 80/20, v/v, im Fall von *P. furiosus* und  $H_2/CO_2$  im Verhältnis 80/20, v/v, im Fall von *M. kandleri*) verwendet wurde (Schopf, 2006). Zur Anzucht der Cokultur wurden beide Organismen gleichzeitig in einem Verhältnis von 1:4 (*P. furiosus*:*M. kandleri*) in SME-Medium angeimpft. Über die Zellzahlbestimmung in der Thomazählkammer nach 24 h Inkubation wurden Rückschlüsse auf die für das Wachstum beider Archaeen optimale Gasphase gezogen und diese optimiert. Es wurden fünf verschiedene Gasphasen getestet, die sich in ihrem  $H_2$ -Gehalt unterschieden.

Gasphase	<i>P. furiosus</i> Rk	<i>M. kandleri</i> Rk	<i>P. furiosus</i> / <i>M. kandleri</i> Ck
$N_2/CO_2$ (80/20, v/v)	$1,1 \times 10^8$	k. W.	$1,5 \times 10^8$ /k. W.
$N_2/H_2/CO_2$ (75/5/20, v/v/v)	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7/2,6 \times 10^7$
$N_2/H_2/CO_2$ (65/15/20, v/v/v)	$1,0 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8/4,0 \times 10^7$
$N_2/H_2/CO_2$ (35/45/20, v/v/v)	k. W.	$5,0 \times 10^7$	$5 \times 10^6/3,5 \times 10^7$
$H_2/CO_2$ (80/20, v/v)	k. W.	$1,0 \times 10^8$	k. W./ $1,0 \times 10^8$

**Tabelle 3-1: Zellzahlbestimmung von planktonischen *P. furiosus*- und *M. kandleri*-Zellen unter verschiedenen Gasphasen nach 24 h Inkubation.** Vergleich der Zellzahlen in den Reinkulturen mit denen in Cokultur über Auszählen mit der Thomazählkammer; Rk: Reinkultur, Ck: Cokultur, k. W.: kein Wachstum (Schopf et al., 2008).

Wie aus Tab. 3-1 ersichtlich ist, konnte die Cokultur unter den für die Reinkulturen erforderlichen Gasphasen  $H_2/CO_2$  bzw.  $N_2/CO_2$  nicht etabliert werden, da hier das Wachstum eines beteiligten Partners gehemmt wurde. Dieser Befund wies darauf hin, dass *P. furiosus* in der  $N_2/CO_2$  Gasphase nicht ausreichend  $H_2$  produzierte, um das Wachstum für *M. kandleri* zu

ermöglichen. Im Gegenzug wurde *P. furiosus* in der reinen  $H_2/CO_2$  Gasphase durch die hohe Konzentration an  $H_2$  in seinem Wachstum gehemmt. In einer Gasphase, die 45 %  $H_2$  enthielt, konnte *P. furiosus* in Reinkultur nicht und in der Cokultur nur zu geringen Zellzahlen heranwachsen. In einer Gasphase mit 5 %  $H_2$  wuchsen beide Organismen sowohl in der Cokultur, als auch in den Reinkulturen zu vergleichbaren Zellzahlen heran. Aus dieser Beobachtung wurde gefolgert, dass unter diesen Bedingungen kein Vorteil für beide Organismen aus der Cokultur entstand. Im Gegensatz dazu wuchs *P. furiosus* in der Cokultur in etwa um den Faktor zehn besser verglichen mit der Reinkultur unter vergleichbaren Bedingungen, wenn eine Gasphase mit 15 %  $H_2$  verwendet wurde (Abb. 3-1). Auch für *M. kandleri* konnte unter diesen Bedingungen ein leicht stimulatorischer Effekt auf das Wachstum gemessen werden (Abb. 3-1). Aus diesem Grund wurde für weiterführende Versuche mit der Cokultur aus *P. furiosus* und *M. kandleri* eine Gasphase mit 15 %  $H_2$  benutzt.

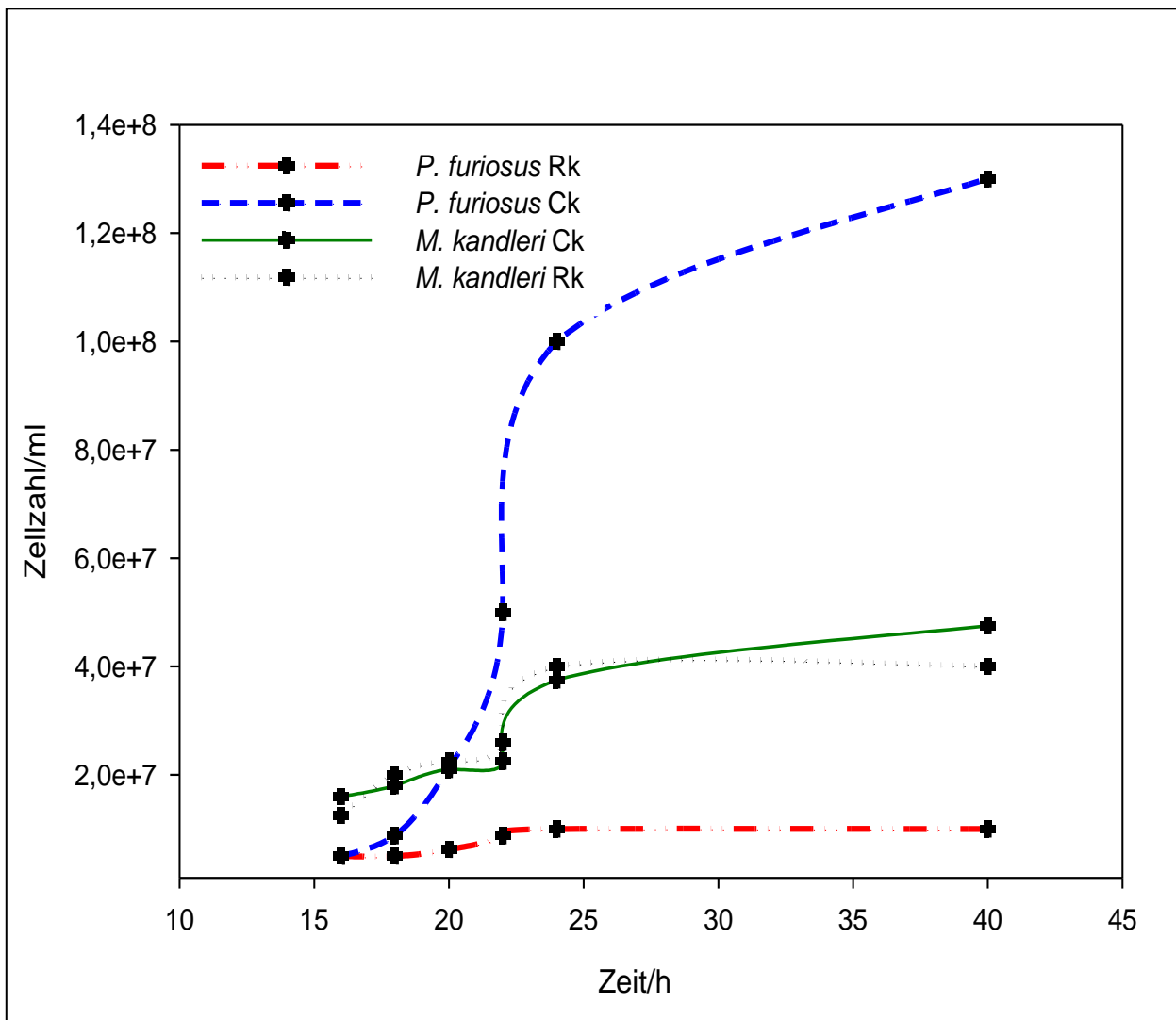
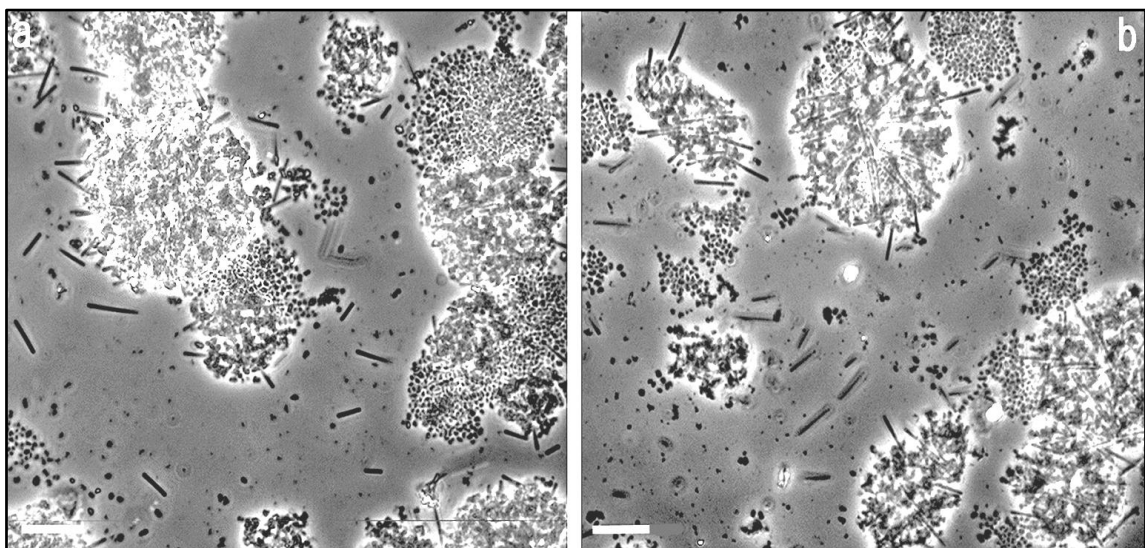


Abbildung 3-1: Wachstumskurven von planktonischen *P. furiosus*- und *M. kandleri*-Zellen in einer  $N_2/H_2/CO_2$ -Gasphase (65/15/20, v/v/v). Vergleich der Zellzahlen in der Reinkultur (Rk) und der Cokultur (Ck).

#### 3.1.2 Biofilmbildung der Cokultur auf Oberflächen

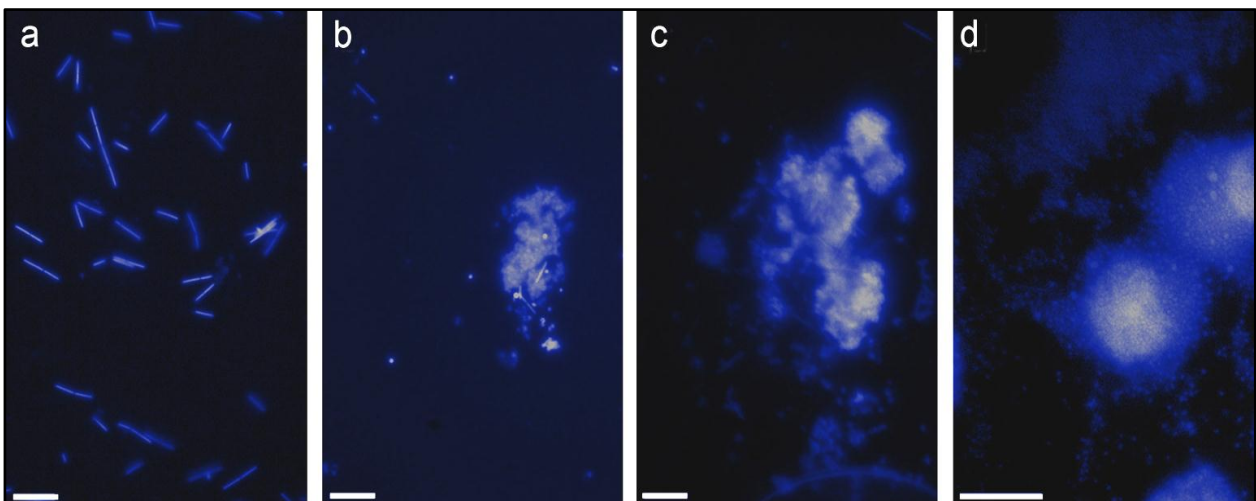
Zur Analyse des Adhäsionsverhaltens der Cokultur waren den Zellen verschiedene Materialien als Wachstumsoberflächen beigelegt worden (Schopf, 2006). Dabei wurden die Oberflächen nach 24 h Inkubation aus den Kulturmedien entnommen und über DAPI-Färbung im Fluoreszenzmikroskop auf Bewuchs untersucht. Es zeigte sich, dass auf fast allen getesteten Oberflächen (z.B. Glimmer, Nickel, Polycarbonat, Glaskohle) Wachstum stattfand. Da jedoch nicht alle Materialien gleich dicht bewachsen wurden, musste davon ausgegangen werden, dass die Zellen zwischen den Oberflächen selektieren können. Bemerkenswert war in diesem Zusammenhang auch, dass die Cokultur auf Deckglas wuchs, einem Material, das zum Zeitpunkt der Etablierung dieser Cokultur von *P. furiosus* alleine nicht bewachsen werden konnte (Näther et al., 2006; Schopf, 2006). Für Langzeitkulturen von *P. furiosus* war im Verlauf dieser Arbeit jedoch eine Veränderung im Adhäsionsverhalten beobachtet worden, auf die später noch genauer eingegangen wird (siehe 3.2). In Cokultur mit *M. kandleri* wuchsen die Zellen auf Deckgläsern in dreidimensionalen Aggregaten, die einen Durchmesser von bis zu 50 µm erreichen konnten. Anhand verschiedener mikroskopischer Techniken wie z.B. der Lichtmikroskopie in Abb. 3-2, bei der sowohl von oben (a) als auch von unten (b) fotografiert wurde, konnte der Aufbau der Zellaggregate dargestellt werden. Die vorhandenen Biofilme waren so strukturiert, dass sich die *M. kandleri*-Zellen stets an der Basis befanden und von einer Vielzahl *P. furiosus*-Zellen bewachsen wurden. Aufgrund der Anordnung der Zellen im Biofilm wurden die Aggregate als Spiegelei-Kolonien bezeichnet.



**Abbildung 3-2: Darstellung von Spiegelei-Kolonien auf Deckglas über Durchlichtmikroskopie.** Detektion der Kolonien von oben (a) und unten (b). Größenstandard 10 µm.

#### 3.1.3 Zeitabhängige Entwicklung des Biofilms

Die Entwicklung des Biofilms auf Deckglas wurde über einen Zeitraum von 15 h hinweg verfolgt. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Oberflächen entnommen und mit Hilfe von Licht- und Fluoreszenzmikroskopie auf Bewuchs hin untersucht. Zur Visualisierung adhärierender Zellen wurde der Farbstoff DAPI verwendet. So konnten nach 4 h Inkubation nur wenige adhärierende *M. kandleri*-Zellen auf der Oberfläche eines Deckglases bei vollkommener Abwesenheit von *P. furiosus* detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Nach 8 h Inkubation war die Zahl an festgehefteten *M. kandleri*-Zellen auf der Oberfläche signifikant gestiegen, wohingegen *P. furiosus* noch immer nicht vorhanden war (Abb. 3-3 a). Die weitere Entwicklung zum Biofilm verlief danach sehr schnell: Schon nach weiteren 4 h Inkubation waren Mikrokolonien mit einem Durchmesser von 10-20 µm auf den Deckgläsern vorhanden (Abb. 3-3 b). Innerhalb der folgenden 3 h wuchsen diese Mikrokolonien, so dass sie letztendlich einen Durchmesser von 20-50 µm erreichten (Abb. 3-3 c) und sich zu Spiegelei-Kolonien entwickelten (Abb. 3-3 d). Die Bildung dieser Spiegelei-Kolonien fand nicht nur, wie hier gezeigt, auf Deckglas statt, sondern wurde auch auf Glaskohle beobachtet, bei der es sich um amorphen Kohlenstoff handelt.



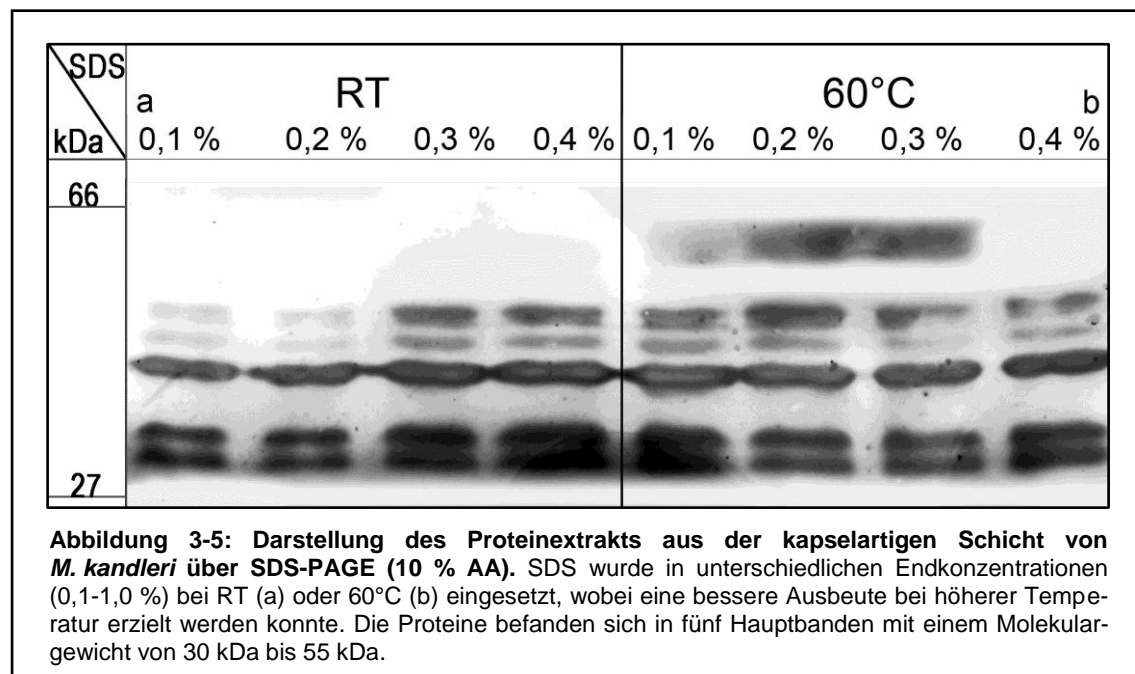
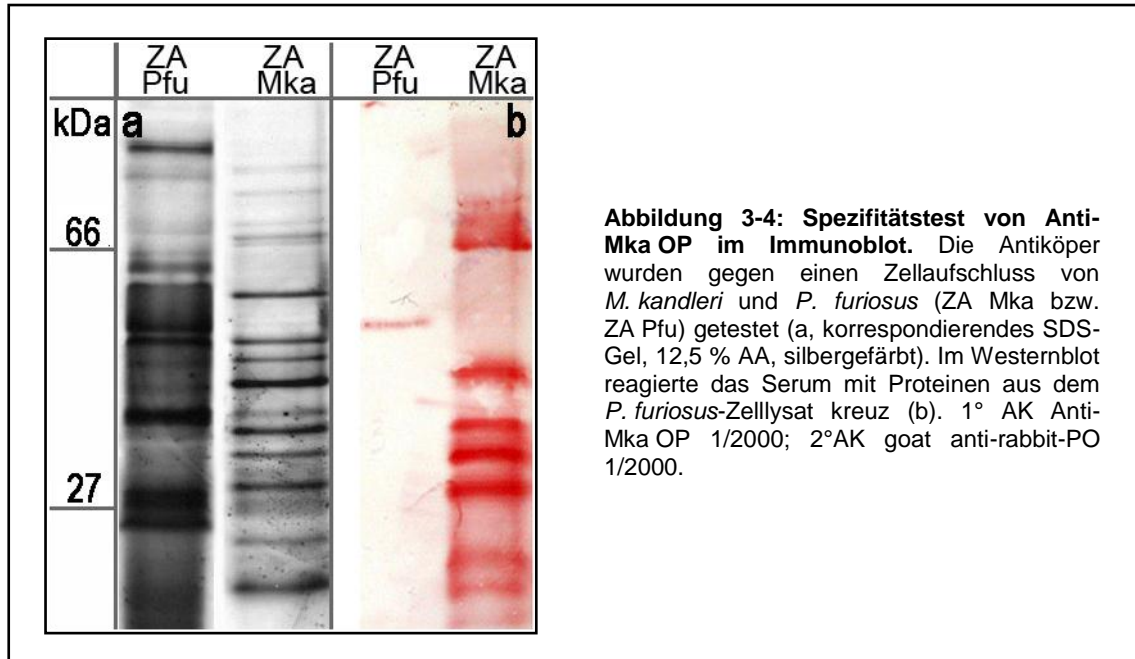
**Abbildung 3-3: Zeitabhängige Entwicklung des Biofilms auf Deckglas.** Die Zellen wurden nach 8 h (a), 12 h (b), 13,5 h (c) und 15 h (d) Inkubation über Epifluoreszenzmikroskopie und DAPI-Staining detektiert. Größenstandard 10 µm.

#### 3.1.4 Analyse der dreidimensionalen Biofilmstruktur

Die Unterscheidung von *P. furiosus* und *M. kandleri* im Lichtmikroskop war aufgrund der Morphologie der Organismen möglich, die dreidimensionale Anordnung der Zellen in den Spiegeleikolonien konnte so jedoch nur schlecht dargestellt werden. Zur Auflösung der dreidimensionalen Struktur des archaeellen Bi-Spezies-Biofilms wurde auf Epifluoreszenz- und konfokale Lasermikroskopie (CLSM) zurückgegriffen. Um die beiden Zelltypen möglichst spezifisch unterscheiden zu können, sollten sie mit Antikörpern markiert werden, die gegen Proteine und Zucker auf der Zelloberfläche des jeweiligen Organismus gerichtet waren. Die resultierenden IgGs gegen *P. furiosus* und *M. kandleri*-Zelloberflächenkomponenten (als Anti-Pfu OP und Anti-Mka OP bezeichnet) sollten mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und in Immunlokalisationsexperimenten zum Einsatz gebracht werden.

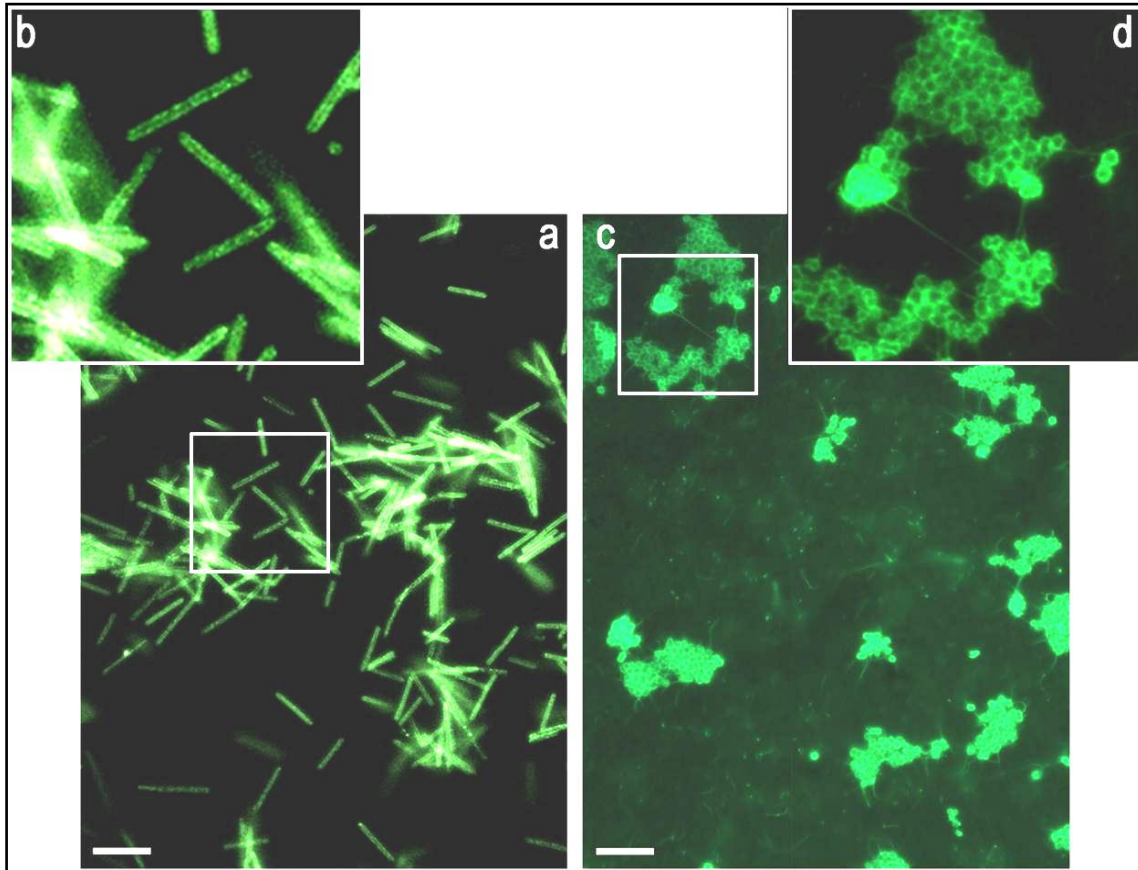
Die Antikörper wurden in Kaninchen produziert, wobei die Zellanhänge von *P. furiosus* vor der Immunisierung mechanisch mit dem Ultraturrax abgeschert wurden. Mit diesem Schritt sollte verhindert werden, dass sich im polyklonalen Antikörperpool des Kaninchens IgGs gegen Flagellen befinden, da diese die Ablösung adhärierender Zellen bewirken können (Näther et al., 2006). Für *M. kandleri* waren potentiellen Fimbrien nachgewiesen worden (Schopf, 2006), die mit dem Ultraturrax entfernt wurden, bevor die Zellen einem Kaninchen zur Immunisierung gespritzt wurden. Nach zwei aufeinander folgenden Boosterinjektionen wurde das Antiserum (Anti-Mka OP) im Westernblot auf seine Spezifität und seinen Titer getestet. Das Resultat war, dass das Antiserum mit Proteinen aus einem Zellextrakt von *P. furiosus* kreuzreagierte (Abb. 3-4). In einer erneuten Immunisierungsrunde sollte die Spezifität der Antikörper für *M. kandleri* erhöht, sowie eine Kreuzreaktionen mit *P. furiosus* minimiert werden. Zu diesem Zweck sollten Proteine aus der kapselartigen Schicht extrahiert werden, in welche die *M. kandleri*-Zellen eingebettet sind. Die Existenz dieser Kapsel ist seit längerem bekannt (Kattenbeck, 1992), ihre Zusammensetzung aber nicht definiert. Die Extraktion der Proteine aus der Kapsel wurde durch eine Behandlung der Zellen mit dem Detergenz SDS in verschiedenen Endkonzentrationen bewerkstelligt. Wie die Analyse über SDS-PAGE zeigte, konnte so ein Extrakt gewonnen werden, der hauptsächlich aus Proteinen in fünf Banden mit einer molekularen Masse von ca. 30 bis 55 kDa bestand (Abb. 3-5). Eine Verunreinigung des Extrakts durch cytosolische Proteine konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, da die *M. kandleri*-Zellen nach der Detergenzbehandlung mikroskopisch auf ihre Intaktheit untersucht worden waren. Mit ansteigender SDS-Konzentration und einer Erhöhung der Inkubationstemperatur von RT auf 60°C konnte eine größere Ausbeute an Proteinen extrahiert werden. So gelang es, durch die Behandlung von 0,2 g Zellen (Nassgewicht) mit 2 % SDS bei 60°C insgesamt 300 µg/ml Protein zu gewinnen, was ausreichend war, um Antikörper in einem Kaninchen zu generieren.





Um die Spezifität der Antikörper für die Zelloberfläche des jeweiligen Organismus zu verbessern, wurden die Antiseren mit Zellen des jeweils anderen Typus „abgesättigt“. Dies diente dazu, *Pyrococcus*-spezifische Antigene aus dem *M. kandleri*-Serum abzufangen und umgekehrt. Im letzten Schritt erfolgte die Markierung der Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen, um die Bindung der IgGs an die Zellen fluoreszenzmikroskopisch visualisieren zu können. Dazu wurden die abgesättigten Antikörper direkt mit Farbstoffen der AlexaFluor® Reihe (AF) markiert. Alternativ wurde ein sekundärer, fluoreszenzgelabelter Antikörper, der universell alle Primärantikörper aus der Spezies Kaninchen erkennt (goat anti-rabbit IgG AF488), verwendet. Eine selektive Visualisierung der Bindung von Anti-Pfu OP bzw. Anti-Mka OP, die beide im Kaninchen erzeugt worden waren, war durch den Einsatz des Sekundärantikörpers zwar nicht möglich, jedoch konnte eine Signalverstärkung erzielt werden. Diese kam dadurch zustande, dass viele Sekundärantikörper an den Fc-Teil des primären Antikörpers banden. So konnte gezeigt werden, dass Anti-Mka OP nicht gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche der *M. kandleri*-Zellen band, sondern in Clustern (Abb. 3-6 a+b). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Proteine aus der kapselartigen Schicht ebenfalls geclustert auf der Zelloberfläche vorliegen. Des Weiteren gelang durch den Einsatz des sekundären Antikörpers die Darstellung von Flagellen bei festgehefteten *P. furiosus*-Zellen, die in der Cokultur mit *M. kandleri* gezüchtet worden waren (Abb. 3-6 c+d). Durch diesen Befund wurde deutlich, dass im Immunsystem des Kaninchens IgGs gegen Flagellen gebildet wurden, womit im Umkehrschluss vermutlich nicht alle Zellanhänge durch die Ultratraxbehandlung abgesichert werden konnten. Dies stand im Einklang mit dem Befund, dass adhärierende Zellen sich von der Oberfläche ablösen, wenn sie mit Anti-Pfu OP behandelt wurden. So war die Zahl adhärierender Zellen in einem stets mitgeführten Kontrollansatz, in dem die Zellen nicht mit Antikörper behandelt worden waren, etwa um den Faktor fünf größer.

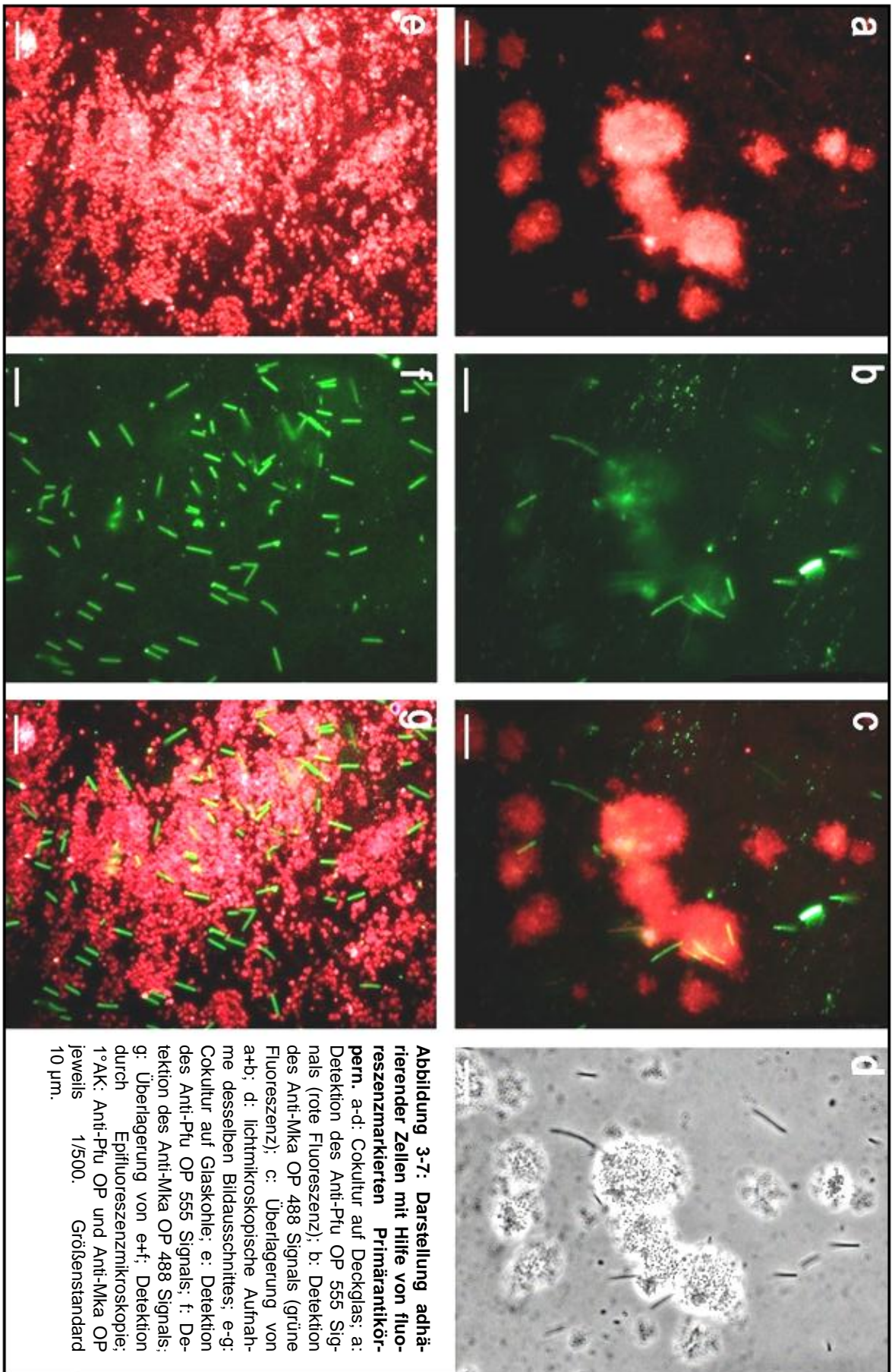
Zur direkten Markierung der Antikörper mit Farbstoffen wurde für Anti-Pfu OP der rote Farbstoff AlexaFluor® 555 (AF555) und für Anti-Mka OP der grüne AlexaFluor® 488 (AF488) verwendet. Für die Darstellung des archaeellen Biofilms wurden beide Antikörper im selben Versuchsansatz gleichzeitig eingesetzt. Auch hier zeigte sich, dass sich adhärierende Zellen und Mikrokolonien von der Oberfläche lösten, wenn sie mit den Primärantikörpern behandelt wurden. Nichtsdestotrotz war vereinzelt die Darstellung von Spiegelei-Kolonien möglich.



**Abbildung 3-6: Signalverstärkung durch die Verwendung von fluoreszenzgelabeltem Sekundärantikörper.** Die Bindung von Anti-Mka OP an planktonischen *M. kandleri*-Zellen konnte so visualisiert werden. Die Antikörperbindung fand nicht gleichmäßig verteilt statt, sondern in Clustern (a und vergrößerter Ausschnitt in b); Bei auf Deckglas gewachsenen *P. furiosus*-Zellen in der Cokultur konnten Flagellen dargestellt werden (c und vergrößerter Ausschnitt in d); Detektion über Epifluoreszenzmikroskopie; 1°AK: Anti-Pfu OP und Anti-Mka OP jeweils 1/1000, 2°AK goat anti-rabbit IgG 1/200. Größenstandard 10 µm.

Über konfokale Lasermikroskopie (CLSM) wurde deutlich, dass beide Antikörperspezies an die Organismen in der Cokultur banden, was durch eine Kreuzreaktion der IgGs hervorgerufen wurde. So kam es im CLSM zu einer Überlagerung der Signale, wenn die Fluoreszenz in zwei Kanälen gleichzeitig detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Bessere Darstellungen von *P. furiosus* und *M. kandleri* in der Cokultur konnten mit dem Epifluoreszenzmikroskop erzielt werden. Hier wurden die Fluoreszenzsignale desselben Bildausschnittes nacheinander im Grün- bzw. im Rotfilter detektiert und anschließend überlagert. Für eine Spiegelei-Kolonie auf Deckglas konnte so gezeigt werden, dass die *M. kandleri*-Zellen an der Basis angesiedelt waren (Abb. 3-7 a-d). Des Weiteren wurde klar, dass die *M. kandleri*- und *P. furiosus*-Zellen in der Cokultur nicht ausschließlich in strukturierten Mikrokolonien vorkommen, sondern auch dispers über die Oberfläche verteilt. Die Anordnung der Zellen schien dabei einem zufälligen Muster zu folgen. Auffällig war hier, dass die beiden Organismen in keinem Kontakt zueinander standen (Abb. 3-7 e-g).





#### 3.2 Veränderung des Adhäsionsverhaltens von *P. furiosus*

Adhäsionsstudien bei *P. furiosus* wurden über lange Zeiträume wiederholt mit den im Labor „laufenden“ Kulturen durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Mikroorganismen vielfach unter den gleichen Bedingungen (in Vollmedium, versetzt mit einer Oberfläche) überimpft wurden. Heute kann nicht mehr nachgeprüft werden, wie lange eine Kultur durch stetige Überimpfungen am Leben erhalten wurde. Sicher ist jedoch, dass innerhalb einer Zeitspanne von mindestens drei Jahren eine Veränderung des Adhäsionsverhaltens von *P. furiosus* im Labor der AG Prof. Wirth beobachtet werden konnte. Bereits im Jahre 2008 (Janker, Diplomarbeit) waren Daten bezüglich des Anheftungsverhalten von *P. furiosus* nicht mehr in Einklang zu bringen mit denen vorangegangener Experimente (Näther et al., 2006). Besonders bemerkenswert erschien in diesem Zusammenhang, dass *P. furiosus* die Fähigkeit erworben hatte, sich an Glas festzuheften. Dieses Material konnte zu früheren Zeitpunkten eindeutig nicht von dem Archaeum bewachsen werden (Näther et al., 2006). Somit hatte bei *P. furiosus* wahrscheinlich eine Selektion hin zum Wachstum auf Glasoberflächen stattgefunden, womit die als ursprünglich beschriebenen Charakteristika verloren gegangen waren. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Organismus tatsächlich noch um *Pyrococcus furiosus* handelt, wurde das Gen für die 16S rRNA einer laufenden Laborkultur (im Folgenden als *Laborstamm* bezeichnet) mit einem archaeellen Vorwärtsprimer und einem universellen Rückwärtsprimer amplifiziert und sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde einer Blast-Suche unterzogen, wobei im Alignment der beste Hit mit einem *e-value* von 0.0 für eine Teilsequenz des 16S rRNA-Gens von *Pyrococcus furiosus* sprach (Sequenz und Alignment siehe 6.3). Somit konnte der *Laborstamm* sowohl als *Pyrococcus furiosus* verifiziert werden, als auch eine Verunreinigung der Kultur durch andere Archaeen weitestgehend ausgeschlossen werden.

In der Bakterienbank der Universität Regensburg (BBR) war ein *Pyrococcus*-Stamm hinterlegt worden, der mit der Bezeichnung Vc1 (DSM 3638) als Typstamm gekennzeichnet ist. Dieser Stamm wurde für alle Experimente zur Motilität und Analyse der Zellanhänge im Labor der AG Prof. Wirth verwendet. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass dieser *Pyrococcus*-Stamm nicht dem bei der DSMZ hinterlegten Typstamm entspricht, da er vor seiner Sicherung in der BBR ebenfalls einige Jahre als Laborkultur im Umlauf gewesen war. In der Arbeitsgruppe von PD W. Hausner wurde von einer Mutation berichtet, die ein am Zuckertransport beteiligtes Operon betrifft (persönliche Mitteilung). Es ist also anzunehmen, dass der „Typstamm Vc1“ (im Weiteren als *Typstamm* bezeichnet) aus der Bakterienbank Regensburg nicht mehr die ursprünglichen Charakteristika von *P. furiosus* besitzt (Fiala und Stetter, 1986), sondern Mutationen in sich trägt. In einer weiteren Studie, in der der *Typstamm* aus der BBR mit dem bei der DSMZ hinterlegten bezüglich Adhäsion und Flagellation verglichen wurde, konnte auf Unterschiede zwischen den beiden Stämmen aufmerksam gemacht werden (Bellack, 2010 b).

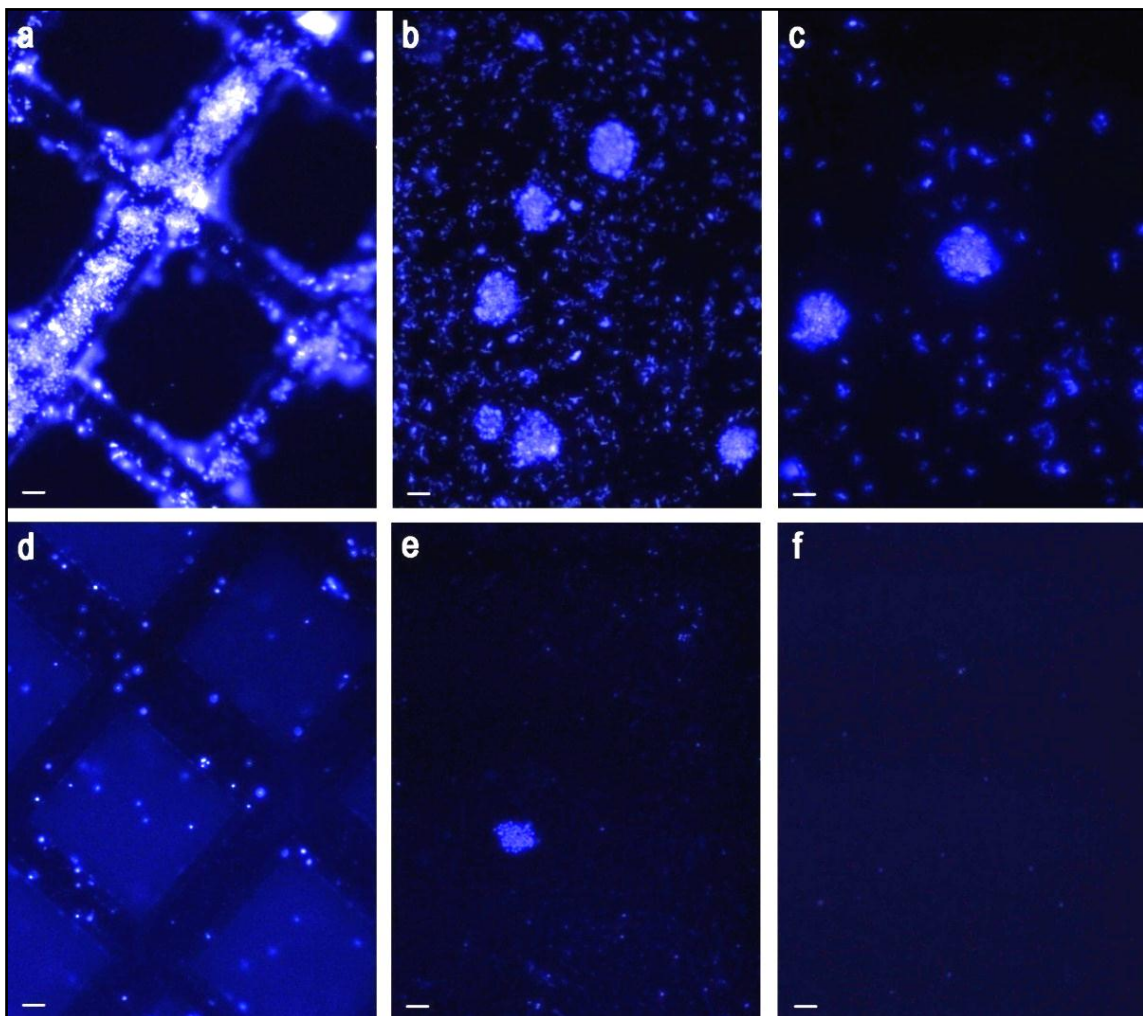
In der hier durchgeführten Studie wurden der *Typstamm* aus der BBR und der aktuelle *Laborstamm* auf Oberflächen mit einem besonderen Fokus auf Glasmaterialien angezüchtet und ihr Adhäsionsverhalten vergleichend analysiert. Dazu wurden beide Stämme bei 95°C in SME-Medium kultiviert, das mit organischen Komponenten angereichert worden war (Hefeextrakt und Pepton, 0,1 % Endkonzentration, w/v). Zuvor waren den Kulturmedien verschiedene Materialien zugesetzt worden, auf denen die Organismen aufwachsen konnten. Die Detektion des Wachstums erfolgte mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Die erzielten Resultate wurden früheren Ergebnissen (Näther et al., 2006) gegenübergestellt (Tab. 3-2).

<b>Stamm (Jahr)</b> <b>Material</b> <b>(Hersteller)</b>	<b><i>P. furiosus</i></b> <b>Laborstamm* (2010)</b>	<b><i>P. furiosus</i></b> <b>Typstamm** (2010)</b>	<b><i>P. furiosus</i></b> <b>Laborstamm***</b> <b>(Näther et al., 2006)</b>
Deckglas (Süsse)	++	+	n.d.
Deckglas (Knittel)	++	(+)	n.d.
Deckglas (Marienfeld)	++	(+)	-
24 x 24 mm			
Deckglas (Marienfeld)	++	(+)	n.d.
24 x 40 mm			
Deckglas (Menzel)	++	(+)	n.d.
Deckglas (Süsse)	++	(+)	n.d.
Objektträger (Assistent)	++	(+)	n.d.
Serumflaschenglas	+	-	n.d.
Aluminium	++	(+)	+
Emaile	++	-	+
Nickel	+++	+	+++
PC	+++	+	+++
PTFE	++	+++	(+)
<b>Plexiglas<sup>P</sup></b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>
PVC	++	+	+
Silizium Wafer	+	+	++

**Tabelle 3-2: Adhäsionsverhalten von *P. furiosus*.** +++ sehr gutes Wachstum in Mikrokolonien/über die ganze Oberfläche verteilt; ++ gutes Wachstum; + Einzelzellen über die Oberfläche verteilt; (+) sehr vereinzelt Zellen; - kein Wachstum; n.d. nicht definiert; \*aktueller *Laborstamm* von *P. furiosus* in der AG Prof. Wirth; \*\*regenerierter *Typstamm* Vc1 aus der BBR; \*\*\*im Jahre 2006 verwendete Laborkultur von *P. furiosus*; <sup>P</sup>Positivkontrolle, Referenz für sehr gutes Wachstum.



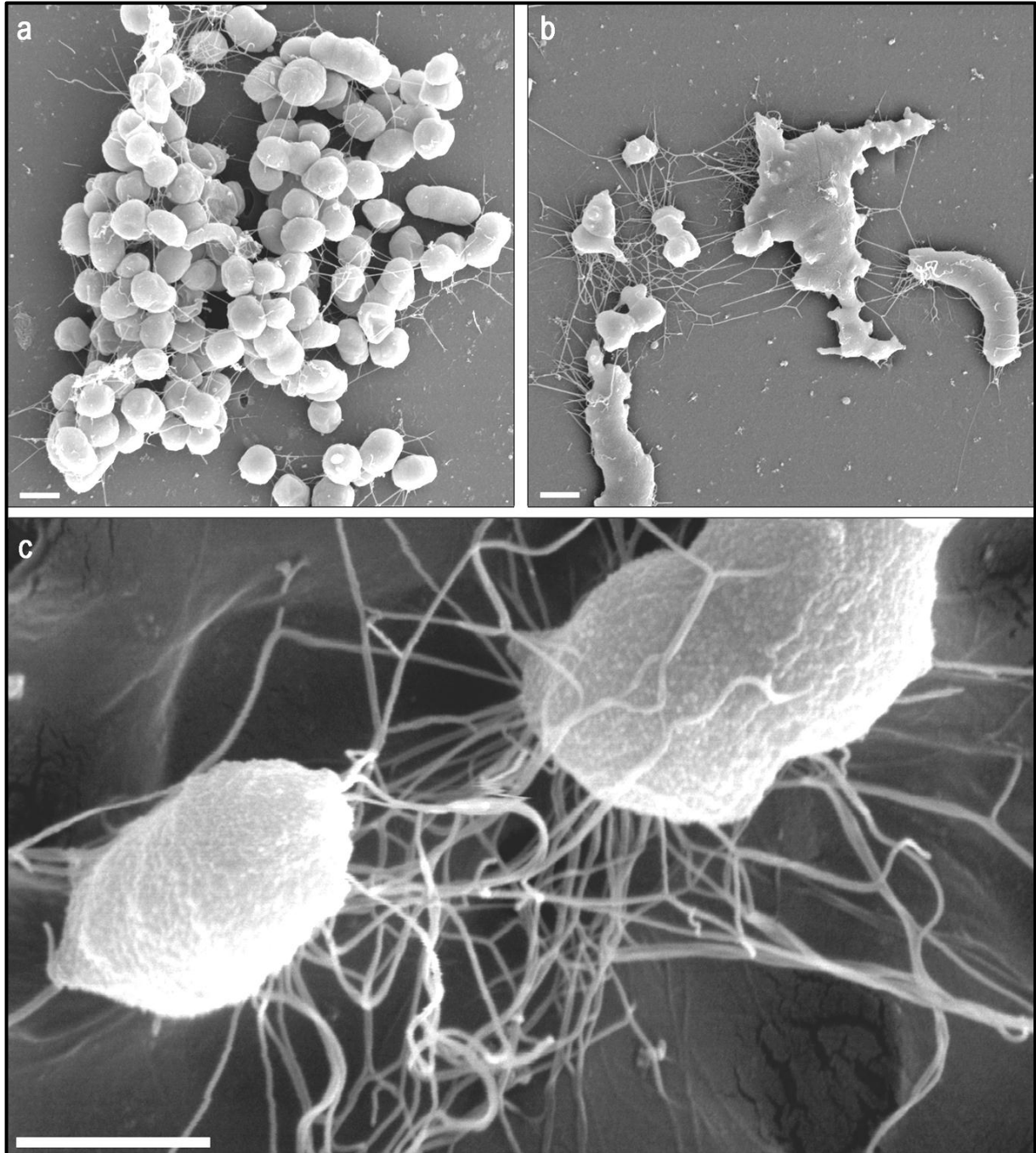
Auf Plexiglas wurde das Wachstum sowohl des *Labor-* als auch des *Typstamms* als sehr gut eingestuft, was auch im Einklang mit früheren Resultaten stand und deswegen als Referenz für sehr gutes Wachstum herangezogen wurde. Alle Glasmaterien, mit Ausnahme von Serumflaschenglas, wurden vom *Laborstamm* gut als Wachstumsflächen akzeptiert. Beim *Typstamm* hingegen adhärten nur vereinzelt Zellen auf den Deckgläsern, auf Serumflaschenglas fand kein Wachstum statt. Verglich man das Adhäsionsverhalten des aktuellen *Laborstamms* mit früheren Ergebnissen, so stimmten die Daten kaum überein. Lediglich auf den Materialien Nickel und PC verhielt sich der *Laborstamm* ähnlich, wie es in den Experimenten 2006 beschrieben worden war und zeigte einen dichten Bewuchs auf der ganzen Oberfläche. Auffällig beim *Typstamm* war, dass er sich weniger gut an diesen Materialien anheftete, so dass nur vereinzelt Kolonien detektiert werden konnten (Abb. 3-8).



**Abbildung 3-8: Epifluoreszenzaufnahmen adhärierender *P. furiosus*-Zellen.** a-c: *Laborstamm*; auf Nickel (a), PC (b) und Deckglas Menzel (c); d-f: *Typstamm*; auf Nickel (d), PC (e) und Deckglas Menzel (f); Detektion über Epifluoreszenzmikroskopie und DAPI-Färbung. Größenstandard 10 µm.

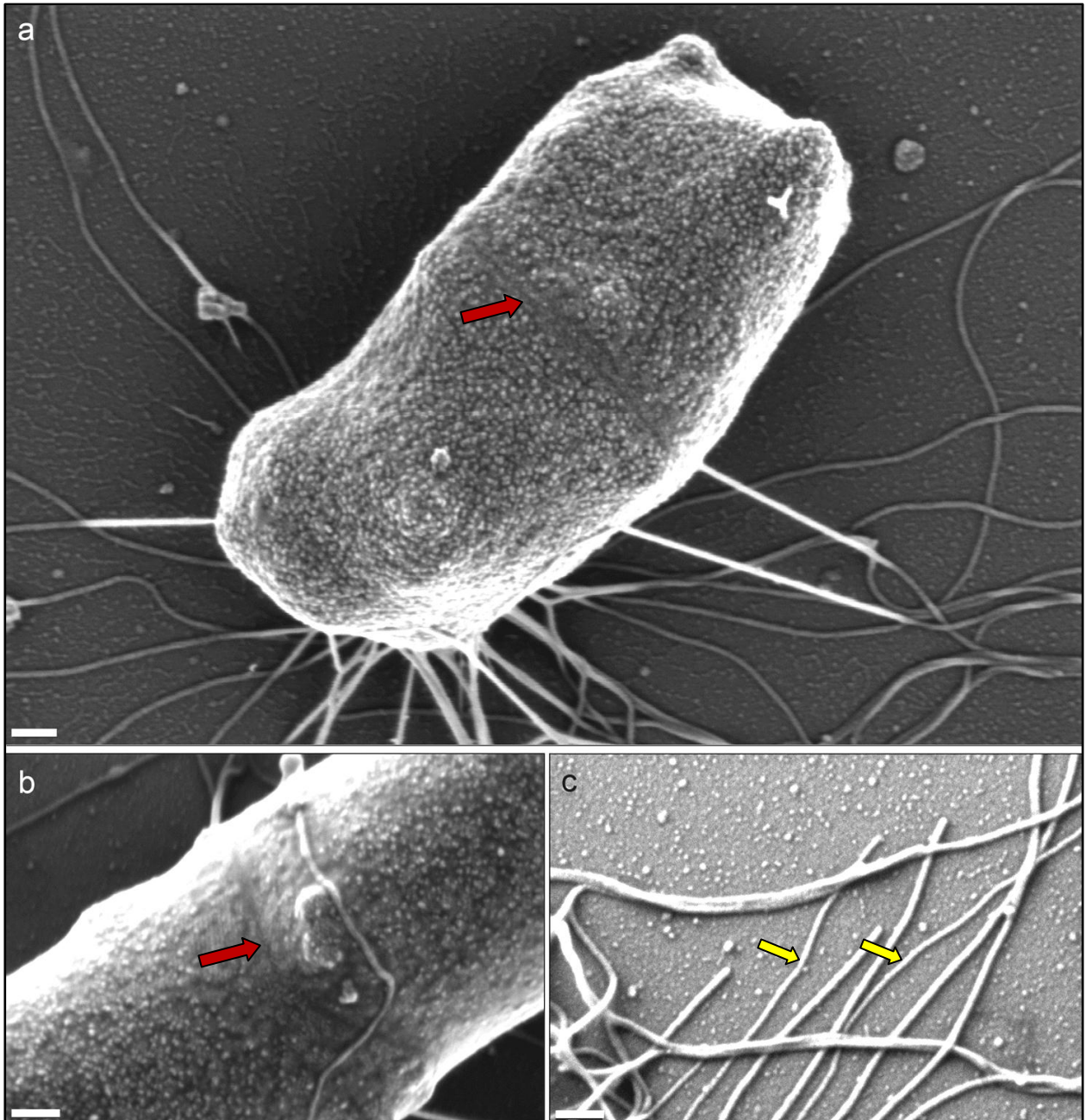
Auch auf anderen Oberflächen zeigte der *Typstamm* ein Adhäsionsmuster, das von dem des aktuellen *Laborstammes* und dem aus dem Jahre 2006 abwich. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass jeder der drei untersuchten Stämme sein eigenes Adhäsionsmuster aufweist. Allerdings konnte sich der aktuelle *Laborstamm* aus dem Jahr 2010 an alle in dieser Studie getesteten Materialien anheften, wobei der Bewuchs vorwiegend als sehr gut oder gut eingestuft wurde (Tab. 3-2). Dieser Befund stützte die These, dass Langzeitkulturen im Labor zum Wachstum auf Oberflächen hin selektioniert werden.

Adhärierende Zellen des *Labor-* und des *Typstamms* wurden im Hitachi 4000 Rasterelektronenmikroskop (REM) auf morphologische Unterschiede hin untersucht. Hierbei wurde ersichtlich, dass die beiden Stämme sich in ihrem Erscheinungsbild stark differenzierten. Bei den Zellen des *Typstamms* handelte es sich um unregelmäßig geformte Kokken mit einem Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  (Abb. 3-9 a). Diese Zellform war ursprünglich auch für *P. furiosus* beschrieben worden (Fiala und Stetter, 1986). Einige Zellen des *Laborstamms* waren jedoch so atypisch geformt, dass sie allein aufgrund dessen nicht mehr als Kokken bzw. als Vertreter der Gattung *Pyrococcus* zu identifizieren waren (Abb. 3-9 b). Diese Zellen besaßen eine extrem uneinheitliche Morphologie, wobei neben länglichen Formen auch stark unregelmäßige Kokken und Zellen auftraten. Eine Gemeinsamkeit beider Stämme war, dass sie sich mit ihren Flagellen an der Unterlage anhefteten. Abbildung 3-9 c zeigt zwei *Laborstamm*-Zellen, die miteinander durch ein Netzwerk ihrer Flagellen verbunden sind und an der Plexiglas-Oberfläche festheften. Aufnahmen von adhärierenden Zellanhängen mit hoher Vergrößerung und Auflösung wurden mit einem Zeiss Auriga Rasterelektronenmikroskop gemacht (Abb. 3-10 c). Dies ermöglichte neben Flagellen auch die Darstellung von dünneren Zellanhängen ( $< 13 \text{ nm}$ ), welche an der Adhäsion beteiligt waren (Abb. 3-10 c, gelbe Pfeile). Von der Existenz dieser dünnen Zellanhänge war bereits mehrfach berichtet worden (Näther, 2007; Barth, 2008), jedoch konnten diese nicht näher charakterisiert werden. Mit dem Zeiss Auriga gelang die Aufnahme einer *Laborstamm*-Zelle mit sichtbarem Teilungsseptum (roter Pfeil in Abb. 3-10 a bei 45000facher Vergrößerung und 3-10 b bei 93000facher Vergrößerung). Das Vorhandensein von klar erkennbaren Teilungsregionen deutet darauf hin, dass die Zellen keinen Defekt in der Zellteilungsmaschinerie aufweisen, was durch die Tatsache unterstützt wird, dass der *Labor-* und der *Typstamm* gleich gut gezüchtet werden konnten (Zellzahl etwa.  $7,5 \times 10^7$  Zellen/ml nach 15 h Inkubation bei  $95^\circ\text{C}$ ).



**Abbildung 3-9: Morphologie von *P. furiosus*-Zellen auf Plexiglas im REM.** Kokkoide Morphologie beim *Typstamm* (a) im Vergleich zur stark unregelmäßigen und atypischen Zellform des *Laborstammes* (b); Größenstandard 1  $\mu\text{m}$ . Zellen des *Laborstammes* (c), die mit den Flagellen am Plexiglas adhärieren. Größenstandard 100 nm.



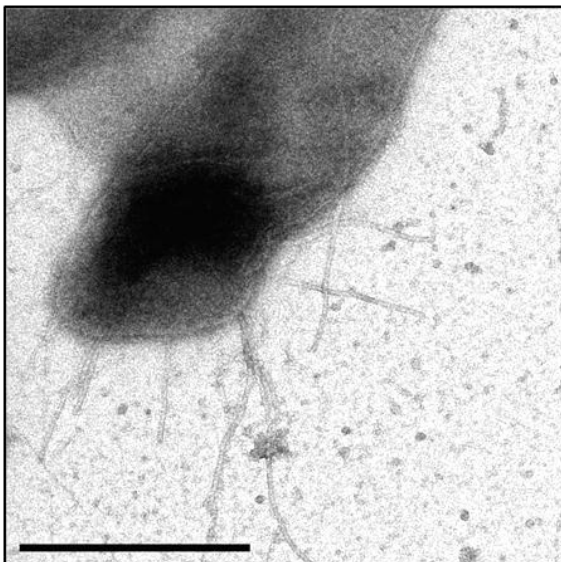


**Abbildung 3-10: Darstellung einer *Laborstamm*-Zelle über hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie.** Das sichtbare Teilungsseptum (a+b, rote Pfeile) deutet auf eine funktionierende Zellteilung hin. Die Zelle haftet mit den Flagellen, aber auch mit dünneren ( $< 13$  nm) Zellanhängen an der Oberfläche. Größenstandard 100 nm.

#### 3.3 Aufreinigung der Flagellen von *P. furiosus*

##### 3.3.1 Abscheren der Zellanhänge mit dem Ultraturrax

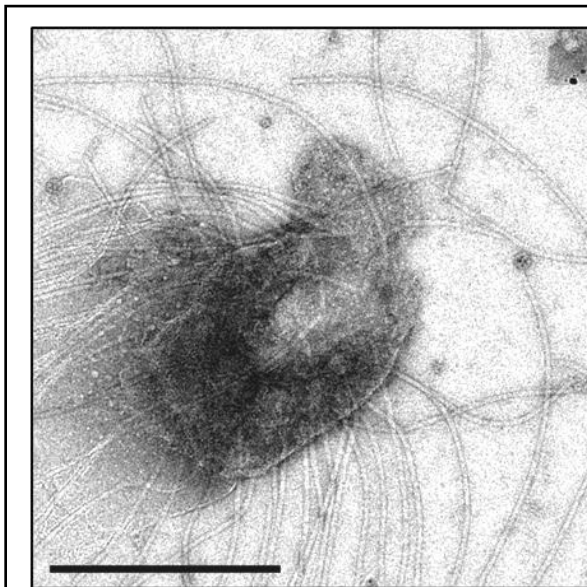
Bei der Aufreinigung der Flagellen von *P. furiosus* waren drei Kriterien von großer Wichtigkeit, die als Voraussetzung für eine erfolgreiche Präparationsmethode galten: Die Zellanhänge mussten in hoher Ausbeute, mit großem Reinheitsgrad und möglichst vollständig erhaltener Struktur gewonnen werden können. Bei der bis zu diesem Zeitpunkt im Labor der AG Prof. Wirth verwendeten Standardprozedur zur Flagellenaufreinigung wurden die Zellanhänge mit dem Ultraturrax (T 25, IKA, Staufen) für 1 min bei 13500 Upm und 10 s bei 20500 Upm abgeschert (Näther et al., 2006). Eine weitere Aufreinigung der gescherten Flagellen wurde über differentielle Zentrifugation, deren Abschluss eine isopyknische Dichtegradientenzentrifugation bildete, erzielt. Mit dieser Methode konnten die Flagellen in großer Ausbeute mit einem akzeptablen Reinheitsgrad gewonnen werden, so dass sie für weitere Analysen zur Verfügung standen (Näther, 2007). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellen nach der Ultraturraxbehandlung zeigten jedoch den großen Schwachpunkt dieser Methode auf (Abb. 3-11): Durch die mechanische Scherbehandlung wurden die Zellanhänge an der Basis der Zelle abgebrochen, so dass Strukturen, die an der Verankerung des Filaments in der Cytoplasmamembran beteiligt sind, nicht mit aufgereinigt werden konnten. Außerdem zerbrachen die bis zu 3 µm langen und 13 nm dicken Flagellen häufig in kurze Bruchstücke (< 1 µm; Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3-11: TEM-Aufnahme eines Zellfetzens mit abgebrochenen Flagellen nach der Ultraturraxbehandlung (Gerät IKA).** Wurden die Zellen für 1 min bei 13500 Upm und 10 s bei 20500 Upm geschert, so brachen viele der Zellanhänge an der Basis der Zelle ab. Größenstandard 500 nm. Kontrastierung mit UAc.



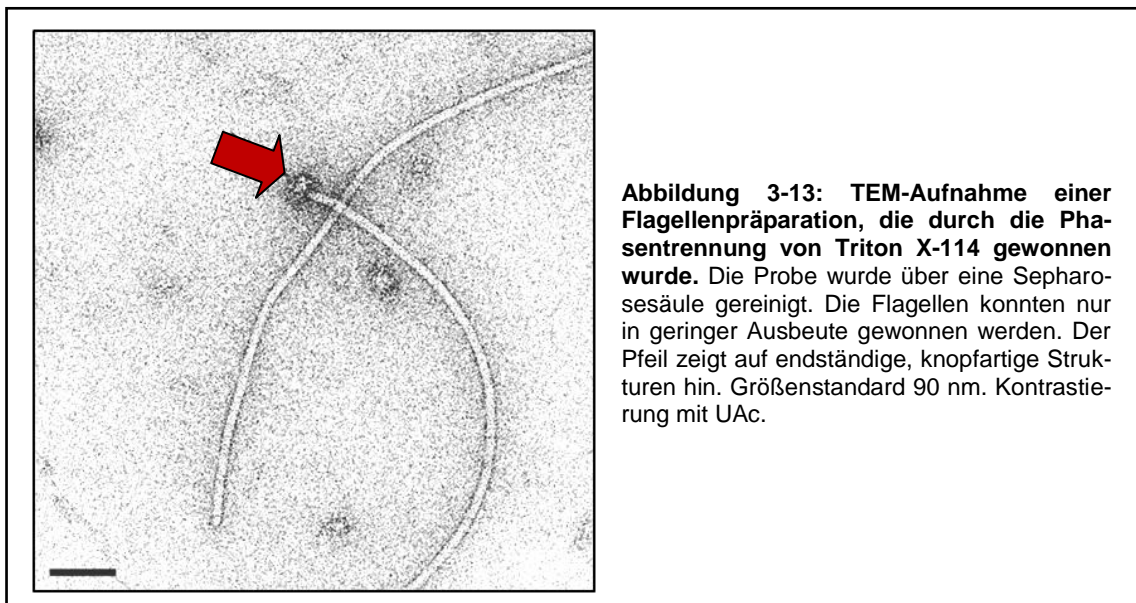
Mit dem Ziel, die Zellanhänge von *P. furiosus* unter Erhaltung ihrer Gesamtstruktur abzuschneiden, wurde zur Präparation ein kleineres Gerät, als der oben erläuterte Ultraturrax T 25, verwendet. Es handelte sich dabei um ein Motorhandstück (Xenox MHX/E Typ 2,35, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe), das mit einem rotierenden Aufsatz bei unterschiedlichen Umdrehungszahlen betrieben werden konnte. *P. furiosus*-Zellen in der früh stationären Wachstumsphase wurden in drei getrennten Versuchsansätzen entweder bei 5000 Upm, 7000 Upm oder 13500 Upm (für jeweils 1 min) geschert. In einem vierten Experiment wurden die Zellen zuerst bei einer Umdrehungszahl von 10000 (für 1 min) und anschließend 17000 Upm (für 10 s) behandelt. Die weitere Aufreinigung der Präparationen erfolgte wie beschrieben (Näther et al., 2007). Bei den Experimenten, die bei 5000 Upm und 7000 Upm durchgeführt worden waren, konnten keine Flagellen isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnten in der bei 13500 Upm durchgeführten Präparation Zellanhänge angereichert werden, die jedoch stark mit Zellfragmenten verunreinigt waren. In Abb. 3-12 ist solch ein Zellrest mit einer Vielzahl von inserierenden Flagellen dargestellt. Ein hoher Grad an Verunreinigung wurde auch beim Scheren der Zellen mit 10000 und 17000 Upm beobachtet. Zusätzlich wurden die Flagellen durch die mechanischen Kräfte in Bruchstücke zerlegt (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend verdeutlichten diese Experimente, dass die Zellanhänge unter der Einwirkung von Scherkräften nicht intakt und strukturerhaltend präpariert werden konnten.



**Abbildung 3-12: TEM-Aufnahme einer Flagellenpräparation nach der Ultraturraxbehandlung bei 13500 Upm (Gerät Roth).** Die Präparation war stark mit Zellresten verunreinigt, wobei es sich bei dem hier dargestellten um den Flagelleninsertionspunkt mit daraus entspringenden Zellanhängen handelt. Größenstandard 500 nm. Kontrastierung mit UAc.

#### 3.3.2 Phasenseparation mit Triton X-114 (Kalmokoff et al., 1988)

Das Detergenz Triton X-114 löst sich ab einer Temperatur von 0°C in wässrigen Puffern, trennt sich jedoch über 22°C in zwei Phasen auf: eine Triton X-114-reiche ölige untere Phase und eine Triton X-114-arme obere Phase. Integrale Membranproteine befinden sich in der öligen Phase, wohingegen sich hydrophile Proteine in der wässrigen Phase anreichern. Das dargestellte Experiment stellt eine Abwandlung des Protokolls von Kalmokoff et al. (1988) dar. Die Phasentrennung von Triton X-114 sollte genutzt werden, um integrale Membranproteine von löslichen Proteinen zu trennen und damit die Flagellen samt Verankerung aus der Cytoplasmamembran zu lösen. Bei der Versuchsdurchführung wurden *P. furiosus*-Zellen aus der früh stationären Wachstumsphase durch einen osmotischen Schock in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> aufgeschlossen. Diese Zellsuspension wurde mit Triton X-114 (1 % Endkonzentration, v/v) versetzt und zuerst 1 h bei 4°C, dann 30 min bei 37°C inkubiert, um die Phasentrennung zu induzieren. Nachdem diese erfolgt war, wurde die ölige Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde aufkonzentriert und weiter aufgereinigt. Dies geschah sowohl über eine Molekülsieb-Chromatographiesäule aus Sepharose, als auch über Ultrazentrifugation in einem kontinuierlichen 10-70 %igen Saccharosegradienten bei 44000 x g. Mit letzt genannter Methode konnten keine Flagellen gewonnen werden konnten. Nach der Aufreinigung über eine Sepharosesäule konnten Flagellen isoliert werden, die in wenigen Fällen interessante flagellenendständige Strukturen aufwiesen (Abb. 3-13). Allerdings war die erhaltene Ausbeute (ca. 700 ng pro 1 l eingesetzter Kultur) zu niedrig für weiterführende Analysen. Aufgrund der Tatsache, dass auch hier die Filamente nicht intakt waren und diese Methode eine langwierige experimentelle Durchführung erforderte, wurde sie als ungeeignet eingestuft.



#### 3.3.3 Solubilisierung mit Nonidet P40

##### Experimentelle Durchführung

Nonidet P40 wurde mit dem Ziel verwendet, die Zellanhänge möglichst schonend aus der Zellwand herauszulösen. Da das nicht-ionische Detergenz frei von jeglichen Peroxiden und Carbonylverbindungen ist, eignet es sich zur Solubilisierung empfindlicher Membranproteine. Der experimentelle Ablauf bestand darin, *P. furiosus*-Zellen aus der früh stationären Phase des Wachstums durch einen osmotischen Schock aufzuschließen und das Zelllysate über mehrere aufeinanderfolgende Zentrifugationschritte von nicht lysierten Zellen abzutrennen. Anschließend wurden die Flagellen zusammen mit weiteren Zellbestandteilen über Ultrazentrifugation pelletiert und das resultierende Pellet mit Nonidet P40 (0,5 % Endkonzentration, w/v) versetzt, um die Membranproteine zu solubilisieren. Zur Optimierung der Solubilisierungseffizienz wurden die Proben sowohl für 1-1,5 h bei 60°C, als auch üN bei RT unter Rühren inkubiert und anschließend erneut über Ultrazentrifugation pelletiert. Die Abtrennung der Flagellen von solubilisierten Membranproteinen erfolgte über einen CsCl-Dichtegradienten, der für mindestens 48 h bei 250000 x g bis zur Gleichgewichtseinstellung zentrifugiert wurde. Die resultierenden Banden konnten mit einer Kanüle vom Gradienten abgenommen und über SDS-PAGE und Elektronenmikroskopie auf den Gehalt von Flagellen hin untersucht werden. Abb. 3-14 stellt in einem Flussschema den experimentellen Ablauf dar.

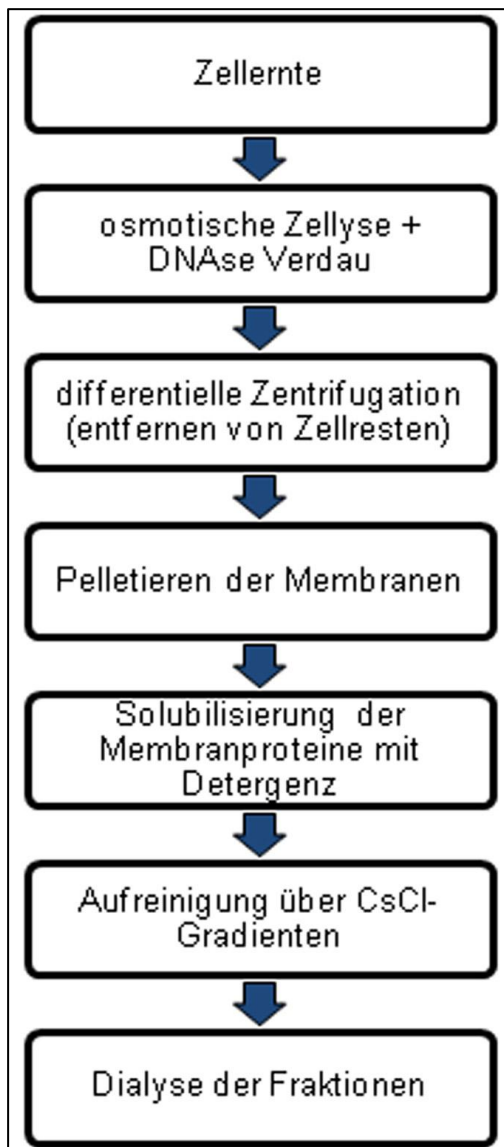
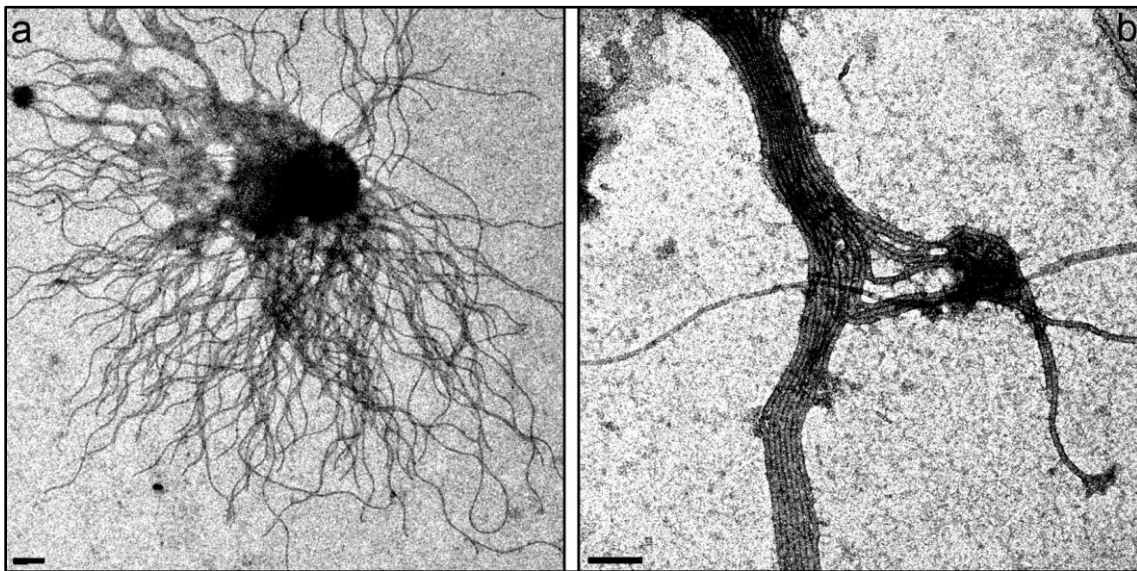


Abbildung 3-14: Flussschema zur Präparation von Flagellen durch Solubilisierung mit Detergenz.

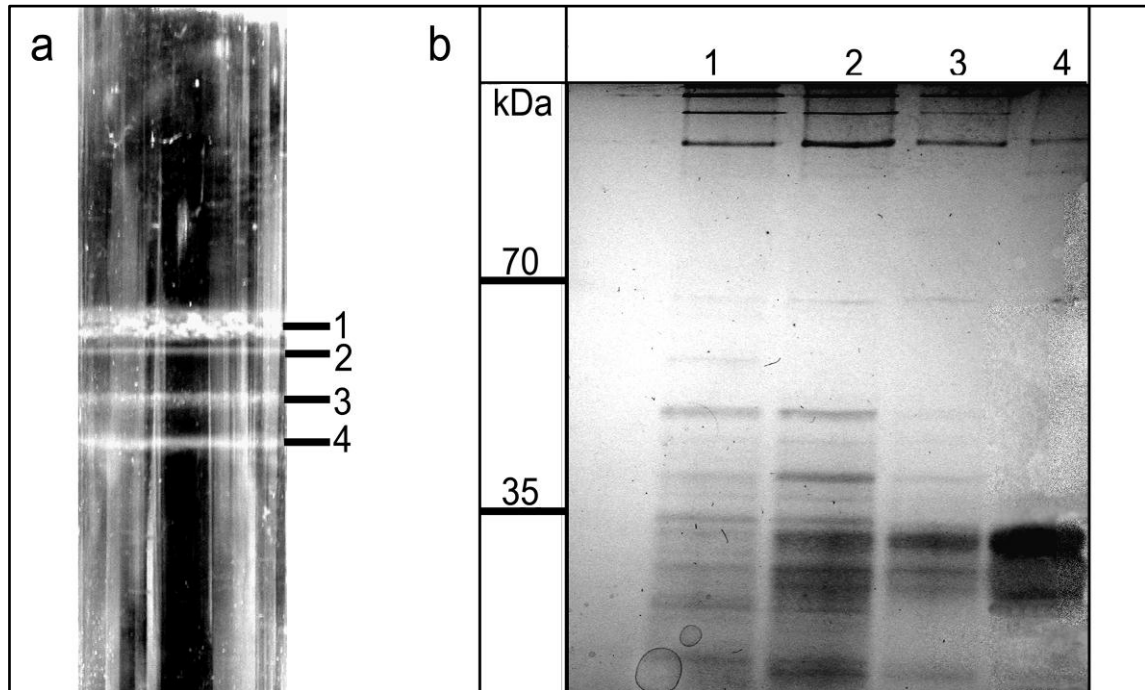
#### Analyse der Flagellenfraktion

Von den einzelnen Schritten der Aufreinigung wurden Suspensionspräparate angefertigt, so dass die Anreicherung von Flagellen im TEM dokumentiert werden konnte. Nach der differentiellen Zentrifugation waren im Überstand noch Zellreste mit Zellanhängen vorhanden (Abb. 3-15 a), die mit Nonidet P40 aus der Cytoplasmamembran gelöst werden konnten. Wurde die Solubilisierung für nur eine Stunde durchgeführt, war die resultierende Flagellenpräparation selbst nach erfolgter Aufreinigung über eine Dichtegradientenzentrifugation verunreinigt. Durch die Verlängerung der Solubilisierungszeit üN konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Aus dem CsCl-Dichtegradienten konnten so vier klar voneinander getrennte Banden (Abb. 3-16 a) abgezogen und in einem SDS-Gel aufgetrennt werden (Abb. 3-16 b). Fraktion Nr. 4 bestand hauptsächlich aus Proteinen mit einem Molekulargewicht von 30-34 kDa, die auf dem Gel eine prominente Doppelbande bildeten. Die Analyse im TEM zeigte, dass Fraktion Nr. 4 zum großen Teil aus Flagellen bestand. Diese waren lang ( $> 2 \mu\text{m}$ ), geschwungen und teilweise sogar als Flagellenbündel erhalten geblieben (Abb. 3-15 b). Trotz positiver Ergebnisse bezüglich der Struktur der Zellanhänge wurde der Reinheitsgrad der erhaltenen Flagellenfraktion als ungenügend bewertet.



**Abbildung 3-15: TEM-Aufnahme von Aufreinigungsschritten.** Zellrest mit inserierenden Flagellen nach der differentiellen Zentrifugation (a). Die Zellanhänge, die aus Fraktion Nr. 4 des CsCl-Gradienten isoliert werden konnten, waren gut strukturiert, so dass sie teilweise gebündelt vorlagen (b). Größenstandard 100 nm. Kontrastierung mit UAc.





**Abbildung 3-16: Solubilisierung mit Nonidet P40.** Resultierender CsCl-Gradient (a) mit den Fraktionen 1-4, (b) korrelierende SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt), wobei die Spuren 1-4 den abgezapften Banden entsprechen; Die Flagellen konnten aus Fraktion Nr. 4 isoliert werden, was sich auf dem Gel als prominente (Doppel-)Bande bei ca. 30 kDa zeigt.

### 3.3.4 Solubilisierung mit DDM

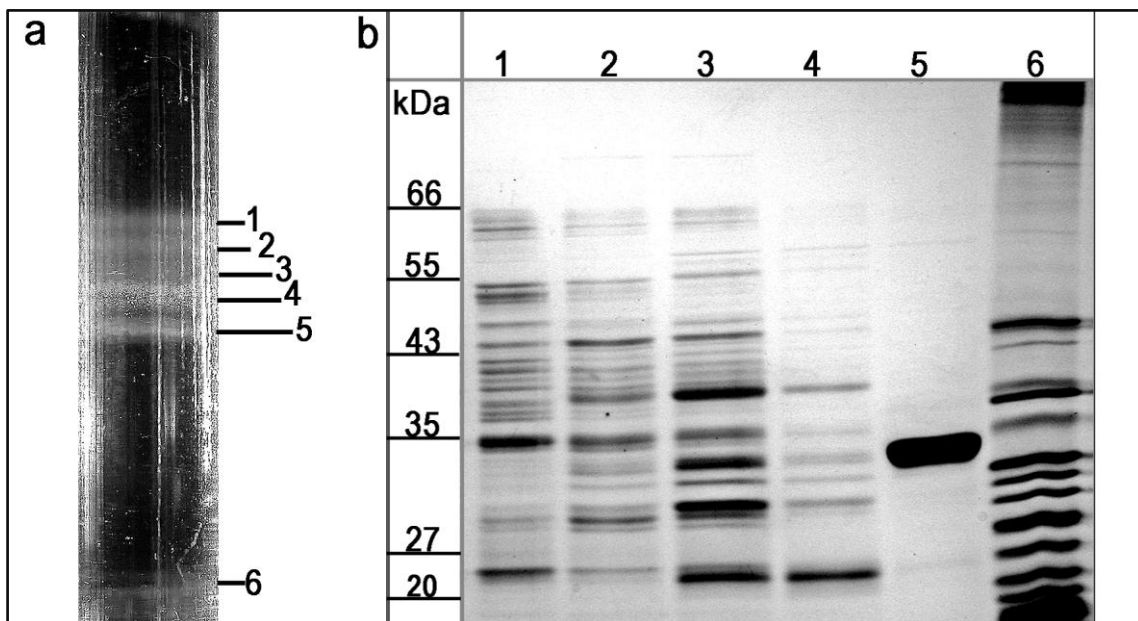
#### Experimentelle Durchführung

In einem weiteren Experiment wurde Nonidet P40, bei sonst gleichbleibendem Versuchsablauf (Flussschema Abb. 3-14), durch das milde nicht-ionische Detergenz DDM (n-Dodecyl-beta-D-Maltopyranosid) ersetzt. Dieses Detergenz gilt als hervorragend geeignet zur Solubilisierung von Membranproteinen, da die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine intakt bleibt und ihre biologische Aktivität somit nicht verändert wird. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde DDM in einer Endkonzentration von 0,5 % (w/v) eingesetzt, wobei die Effizienz wieder unter zwei verschiedenen Bedingungen getestet wurde: In einem Versuchsansatz wurden die Proben für 1-2 h, im anderen üN bei RT unter Rühren inkubiert. Die Abtrennung der Zellanhänge von weiterem Zellmaterial erfolgte durch einen isopyknischen CsCl-Gradienten in der Ultrazentrifuge für mindestens 48 h bei 250000 x g. Es zeigte sich, dass bei der Flagellenaufreinigung mit DDM die besten Ergebnisse, verglichen mit den anderen Detergenzien, erzielt werden konnten. Dies galt insbesondere bei einer Solubilisierung der Proben üN. So konnten nach der Dichtegradientenzentrifugation sechs deutlich voneinander abgegrenzte Banden (Abb. 3-17 a) mit einer Kanüle abgenommen werden. Diese wurden üN gegen 5 mM HEPES (pH 7,0) dialysiert und anschließend über SDS-PAGE analysiert (Abb. 3-17 b). Der Nachteil dieser Methode bestand darin, dass sie nur bedingt zur Flagellenaufreinigung im Großmaßstab geeignet war.

Große Kulturansätze (z.B. aus einem 50 l Fermenter) mussten gesplittet werden und in mehreren parallel laufenden Ansätzen bearbeitet werden, um einen akzeptablen Reinheitsgrad der Flagellenfraktion gewährleisten zu können.

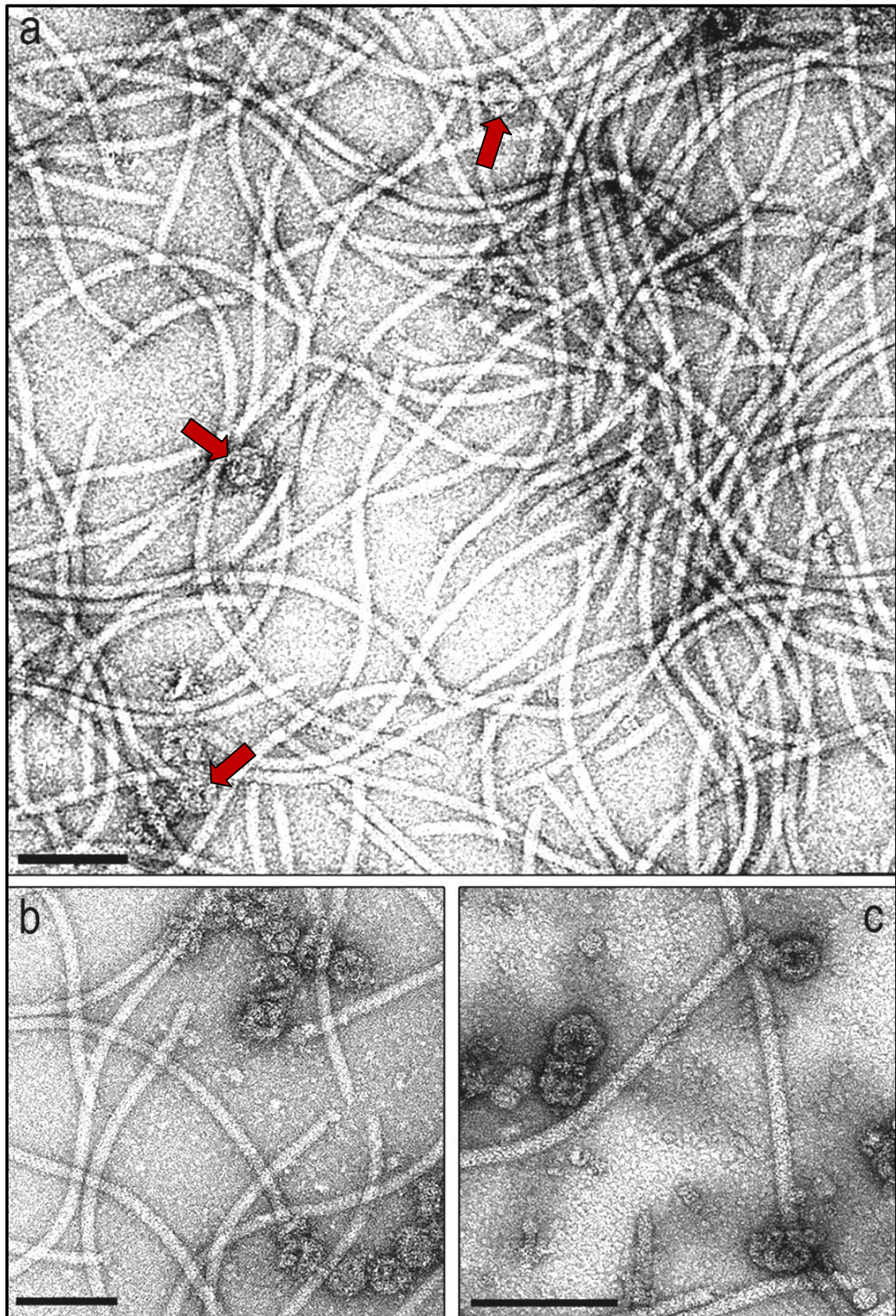
#### Analyse der Flagellenfraktion

Die sechs Fraktionen, die durch Solubilisierung mit DDM aus dem anschließenden CsCl-Gradienten isoliert wurden, liefen im Gel in einem treppenartigen Muster von großen bis hin zu kleiner werdenden Proteinspezies (Abb. 3-17). In Fraktion Nr. 5 waren hauptsächlich Proteine einer Spezies vorhanden, welche sich durch eine prominente Bande bei 30 kDa auszeichneten. Andere Proteine waren in Fraktion Nr. 5 derart unterrepräsentiert, dass sie im silbergefärbten Gel nur als sehr schwach sichtbare Banden bei ca. 20, 40 und 60 kDa auftraten. Die Strukturanalyse im TEM ergab, dass Fraktion Nr. 5 hauptsächlich aus Flagellen bestand. Diese hatten einen Durchmesser von ca. 13 nm, wobei lange (> 2 µm), in sich strukturierte Filamente häufig waren (Abb. 3-18). Flagellen aus solchen Präparationen wurden für weiterführende Analysen verwendet (siehe 3.4 und 3.5). In Fraktion Nr. 5 waren noch weitere Proteine enthalten, die ringförmig waren und in 80 % der Fälle frei in der Probe verteilt vorkamen (Abb. 3-18 a, rote Pfeile), wobei sie häufig auch Aggregate bildeten (Abb. 3-18 b). Der Durchmesser der ringförmigen Strukturen, bei denen es sich um einen aus Oligomeren aufgebauten Proteinkomplex handeln könnte, betrug in etwa 30 nm (Abb. 3-18 c).



**Abbildung 3-17: Flagellenaufreinigung durch Solubilisierung mit DDM (0,5 % Endkonzentration, w/v).** Resultierender CsCl-Gradient (a) mit den Fraktionen 1-6, (b) korrelierende SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt), wobei die Spuren 1-6 den abgezapften Banden entsprechen; Die Flagellen konnten aus Fraktion Nr. 5 isoliert werden, was sich auf dem Gel als prominente Bande bei ca. 30 kDa zeigt.





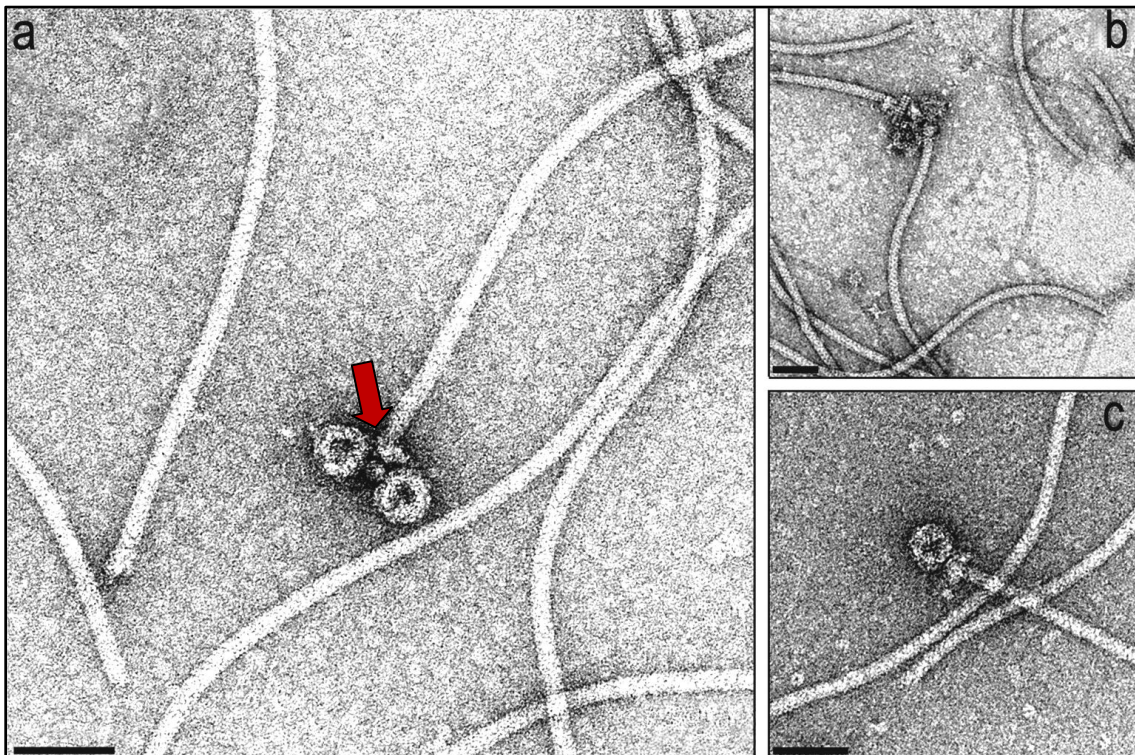
**Abbildung 3-18: TEM-Aufnahme von Fraktion Nr. 5 des CsCl-Gradienten.** Die isolierten Flagellen waren lang, geschwungen und in sich strukturiert. Die roten Pfeile weisen auf ringförmige Strukturen hin (a), die frei in der Flagellenpräparation vorlagen und auch in Aggregaten vorkamen (b). Möglicherweise handelt es sich dabei um Proteinkomplexe, deren Oligomere sich um einen zentralen Kanal anordnen (c). Größenstandard 100 nm. Kontrastierung mit UAc.



#### 3.4 Analyse flagellenassoziierter Strukturen

##### 3.4.1 Analyse im TEM

Der Befund, dass die ringförmigen Strukturen auch in Assoziation mit den Zellanhängen auftreten konnten, war von großem Interesse. Es kam vor, dass ein (Abb. 3-19 c) bis zwei Ringe (Abb. 3-19 a+b) am Ende einer Flagelle lokalisiert waren. Weitere Proteinstrukturen (roter Pfeil), die nicht näher charakterisiert wurden, traten als Verbindungsglied zwischen der Flagelle und den Ringen auf. Letzere erinnerten aufgrund ihrer Struktur an Thermosomen, archaeelle Chaperonine, die aus zwei aufeinander gestapelten oktameren Ringen so zusammengesetzt sind, dass sie eine Fassstruktur bilden.



**Abb. 3-19: Darstellung ringförmiger flagellenassoziierter Proteinkomplexe im TEM.** Am Ende eines Flagellenfilaments konnten sowohl ein (c), als auch zwei Ringe auftreten (a+b), wobei in allen Fällen ein (oder mehrere) unbekannte Verbindungsglieder dazwischen geschaltet waren. Größenstandard 60 nm. Kontrastierung mit UAc.

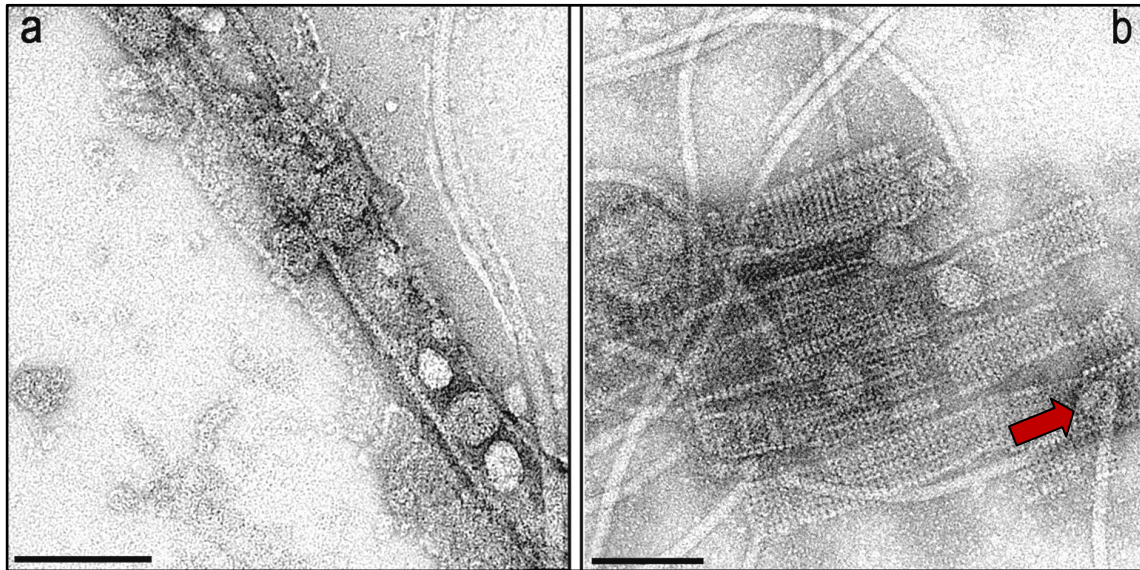
Es wurden mehrere Versuche unternommen, die ringförmigen Proteine für weitere Analysen, z.B. eine Identifikation über Maldi-TOF MS/MS, anzureichern. So wurde eine Flagellenfraktion (vgl. Nr. 5 aus Abb. 3-17 b) auf einen zweiten CsCl-Dichtegradienten aufgetragen und unter selbigen Bedingungen wie oben erläutert bis zur Gleichgewichtseinstellung zentrifugiert. Dadurch war es möglich, die Flagellenfraktion in zwei weitere nahe zusammenliegenden Banden zu separieren. Nach deren Auftrennung in einem SDS-Gel wurde allerdings klar, dass die beiden Banden sich kaum in der Zusammensetzung ihrer Proteine unterschieden, so dass es



keinen Hinweis auf die Anreicherung bestimmter Proteine gab (Daten nicht gezeigt). Außerdem waren sowohl die Flagellen, als auch die ringförmigen Proteine durch die wiederholte Ultrazentrifugation in ihrer Struktur geschädigt worden, was sich im Elektronenmikroskop zeigte. Auch in einem weiteren Versuch, in dem eine Flagellenfraktion über einen Filter der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  (DynaGard 2,5  $\text{cm}^2$  Filter, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gegeben wurde, konnten diese Strukturen nicht angereichert werden. Die Säulenchromatographie über eine Sepharose-Matrix führte ebenfalls nicht zum gewünschten Ergebnis, da hier generell nur wenig Probenmaterial von der Säule eluierte. Es bestand Grund zu der Annahme, dass die Flagellen zur Verstopfung des Säulenmaterials führten, indem sie an der Sepharose „kleben“ blieben.

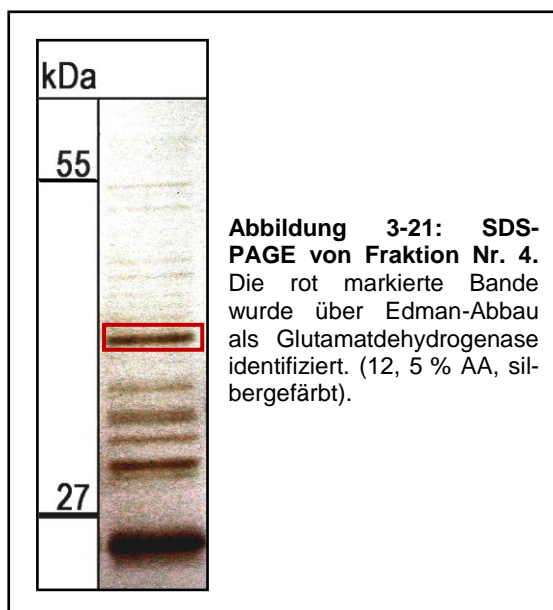
Die Fraktionen Nr. 1-3 und 6 (Abb. 3-17) wurden als irrelevant erachtet, da sie kaum Flagellen, dafür aber Zelltrümmer (1-3) oder kleine Proteine enthielten (Nr. 6; EM-Daten nicht gezeigt). In Fraktion Nr. 4 waren neben einigen Flagellen und weiteren nicht näher definierten Proteinen Strukturen vorhanden, die als interessant im Zusammenhang mit den Flagellen eingestuft wurden. Diese Strukturen traten häufig auf und besaßen einen Durchmesser von ca. 40 nm bei variabler Länge. Aufgrund einer gewissen Ähnlichkeit mit Röhren wurden die beschriebenen Strukturen als *Tubes* bezeichnet. Häufig lagen mehrere *Tubes* nebeneinander, so dass sie vermutlich auch in der Zelle in Clustern vorkommen. Oft hatte es den Anschein, als enthielten die *Tubes* „Einschlüsse“ von cyclischer Anordnung (Abb. 3-20 a), an denen Flagellen inseriert sein konnten (Abb. 3-20 b, roter Pfeil). Einige der cyclischen Einschlüsse ließen an die oben erläuterten ringförmigen Proteinkomplexe denken, vor allem, da sie einen ähnlichen Durchmesser von 30-40 nm besaßen. Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Suspensionspräparaten konnte nicht aufgeklärt werden, ob es sich bei den beschriebenen *Tubes* um hohle Gebilde handelt. Fraglich blieb auch, inwieweit die Verbindung zwischen den Flagellen und den *Tubes* „echt“, d.h. nicht das Resultat eines Präparationsartefaktes war.

Durch Maskierung eines gut schwermetallkontrastierten Bereiches innerhalb eines *Tubes* konnte mit dem Programm EM Menü 4.0 ein Fourier-Spektrum erstellt werden. Die Auswertung der Reflexe ergab, dass es sich um Proteingitter handelt, denen jedoch keine durchgehend regelmäßige Periodizität zugeordnet werden konnte. Eine Aussage über den Wert der Gitterkonstante konnte nicht getroffen werden, da die Reflexe im Fourier-Spektrum zu schwach für eine exakte Auswertung waren. Hierfür waren die kristallinen Bereiche innerhalb der *Tubes* zu klein, was auch damit zusammenhing, dass oft mehrere *Tubes* übereinander lagen. Es kann aber ziemlich sicher davon ausgegangen werden, dass es sich bei den *Tubes* nicht um einen S-Layer handelt (persönliche Mitteilung Prof. R. Rachel).



**Abbildung 3-20: Darstellung von Tubes im TEM.** Insbesondere in Fraktion Nr. 4 waren quasi-kristalline Strukturen (*Tubes*) enthalten, die einen Durchmesser von ca. 40 nm bei variabler Länge besaßen. Häufig hatte es den Anschein, als enthielten die *Tubes* cyclische „Einschlüsse“ (a); In wenigen Fällen konnten an diesen Einschlüssen assoziierte Flagellen beobachtet werden (b). Größenstandard 100 nm. Kontrastierung mit UAc.

#### 3.4.2 Identifikation ausgewählter Proteinbanden



In einem SDS-Gel konnte Fraktion Nr. 4 (siehe 3.3.4) in mehrere Banden aufgetrennt werden, wobei sich die prominenten sechs in einem Bereich von ca. 20-50 kDa befanden (Abb. 3-21). Für die Bande bei 47 kDa (Abb. 3-21, rotes Rechteck) konnte über Edman-Abbau die N-terminale Aminosäuresequenz VEQDPYEIVI bestimmt werden. Der Abgleich mit der NCBI-Datenbank ergab als besten Treffer mit einem *e-Value* von 0,29 und 100 % Sequenzidentität die Glutamatdehydrogenase (GDH) von *P. furiosus*. Dieses Stoffwechsel-enzym katalysiert die reversible oxidative Des-

aminierung von L-Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat und Ammonium. Bei der GDH von *P. furiosus* handelt es sich um einen hexameren Enzymkomplex, der aus identischen Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 47 kDa aufgebaut ist. Die Struktur des metabolischen Enzyms, das im Cytosol stark repräsentiert ist, konnte bereits durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden (Yip et al., 1995). Da das Protein auch aus Membranpräparationen aufgereinigt und auf der Zelloberfläche von *P. furiosus* über Immunlokalisationsexperimente nachgewiesen werden konnte (Bellack et al., 2010 a), wird ihm eine Funktion als Adhäsion zugesprochen.

Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, das Enzym auch in Flagellenpräparationen vorzufinden, die diese in Anlehnung an eine Methode zur Aufreinigung von Membranproteinen durchgeführt wurden. Ein weiteres Protein, das in der *Tubes*-Fraktion über Maldi-TOF MS/MS identifiziert werden konnte, ist Rubrerythrin (Zach, 2009).

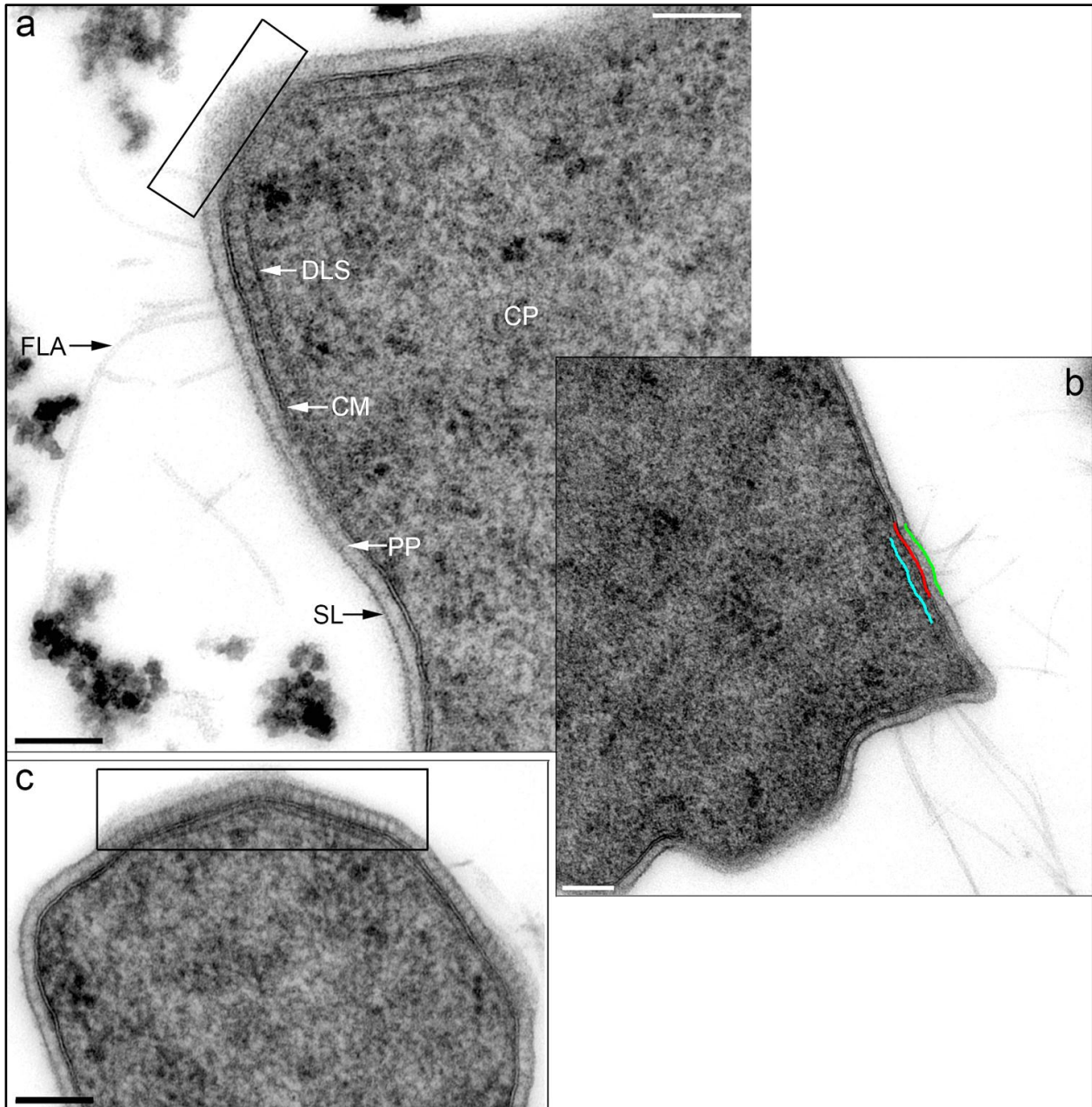
<b>Protein</b>	<b>Molekulare Masse [Prot Pram]</b>	<b>Signalpeptid [FlaFind 1.0, SignalP 3.0]</b>	<b>Transmembranhelix [TMHMM 2.0, Phobius]</b>	<b>Zelluläre Lokalisation [Psorb]</b>	<b>*Identifikation</b>
Glutamat-dehydrogenase	47 kDa	nein	nein	cytoplasmatisch	NTS°
Rubrerythrin	20 kDa	nein	nein	cytoplasmatisch	Maldi (Zach, 2009)

**Tabelle 3-3: Bioinformatische Analyse flagellenassoziierter Proteine anhand verschiedener Vorhersageprogramme.** Die Programme stehen jeweils in eckigen Klammern. \*Maldi: MALDI-TOF MS/MS; NTS: N-terminale Sequenzierung durch Edman-Abbau; °in dieser Arbeit durchgeführt.

#### 3.4.3 Ultradünnschnitte von *Laborstamm*-Zellen

Durch die Analyse von Ultradünnschnitten von *Laborstamm*-Zellen (siehe 3.2) im TEM konnten die Zellkompartimente bestimmt werden (Abb. 3-22 a+b). Das Cytoplasma (CP) ist von einer elektronendichten Cytoplasmamembran (CM, rot skizziert in Abb. 3-22 b) umgeben. Es folgt ein Periplasma (PP), dem eine „schwächer kontrastierte äußere Schicht“ (Fiala und Stetter, 1986) aufgelagert ist. Dabei handelt es sich vermutlich um einen aus Glykoproteinen aufgebauten S-Layer (SL, grün skizziert in Abb. 3-22 b), der jedoch schwierig zu präparieren ist und bislang nicht eindeutig identifiziert werden konnte (Schuster, 2003; Zach, 2009). In der Region des Flagellenaustritts aus der Zelle konnte eine weitere Schicht detektiert werden, die unterhalb der Cytoplasmamembran als elektronendichte Linie ähnlich zu biologischen Membranen auftrat. Dieses Phänomen wurde bei *H. salinarum* als *discoid lamellar structure* (DLS, türkis skizziert in Abb. 3-22 b) bezeichnet und als Verankerungspunkt der Flagellen postuliert (Metlina, 2004).





**Abbildung 3-22: Ultradünnschnitte von *P. furiosus* Laborstamm.** a+b: Darstellung der Kompartimentierung der Zelle in Cytoplasma (CP) und Periplasma (PP) durch die Cytoplasmamembran (CM bzw. rot). Des Weiteren traten eine äußere schwächer kontrastierte Schicht (SL bzw. grün), sowie eine innere *discoid lamellar structure* (DLS bzw. türkis) in der Polregion auf, wo auch die Flagellen (FLA) inserierten. Hier konnten auch membrandurchspannende Komplexe (a+c, schwarze Rechtecke) detektiert werden. Größenstandard 100 nm.

Aus den Ultradünnschnitten geht hervor, dass die Flagellen (FLA) von *P. furiosus* durch die äußere Schicht hindurch zur Cytoplasmamembran reichen. Ob eine Verbindung bis zu der postulierten *discoid lamellar structure* (DLS) unterhalb der Cytoplasmamembran besteht, konnte nicht dargestellt werden. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, dass es sich bei der beschriebenen elektronendichten Linie um Chemotaxisrezeptoren handelt, die, wie im Fall von *E. coli*, an den Zellpolen lokalisiert sind (Maddock und Shapiro, 1993; Skidmore et al., 2000).

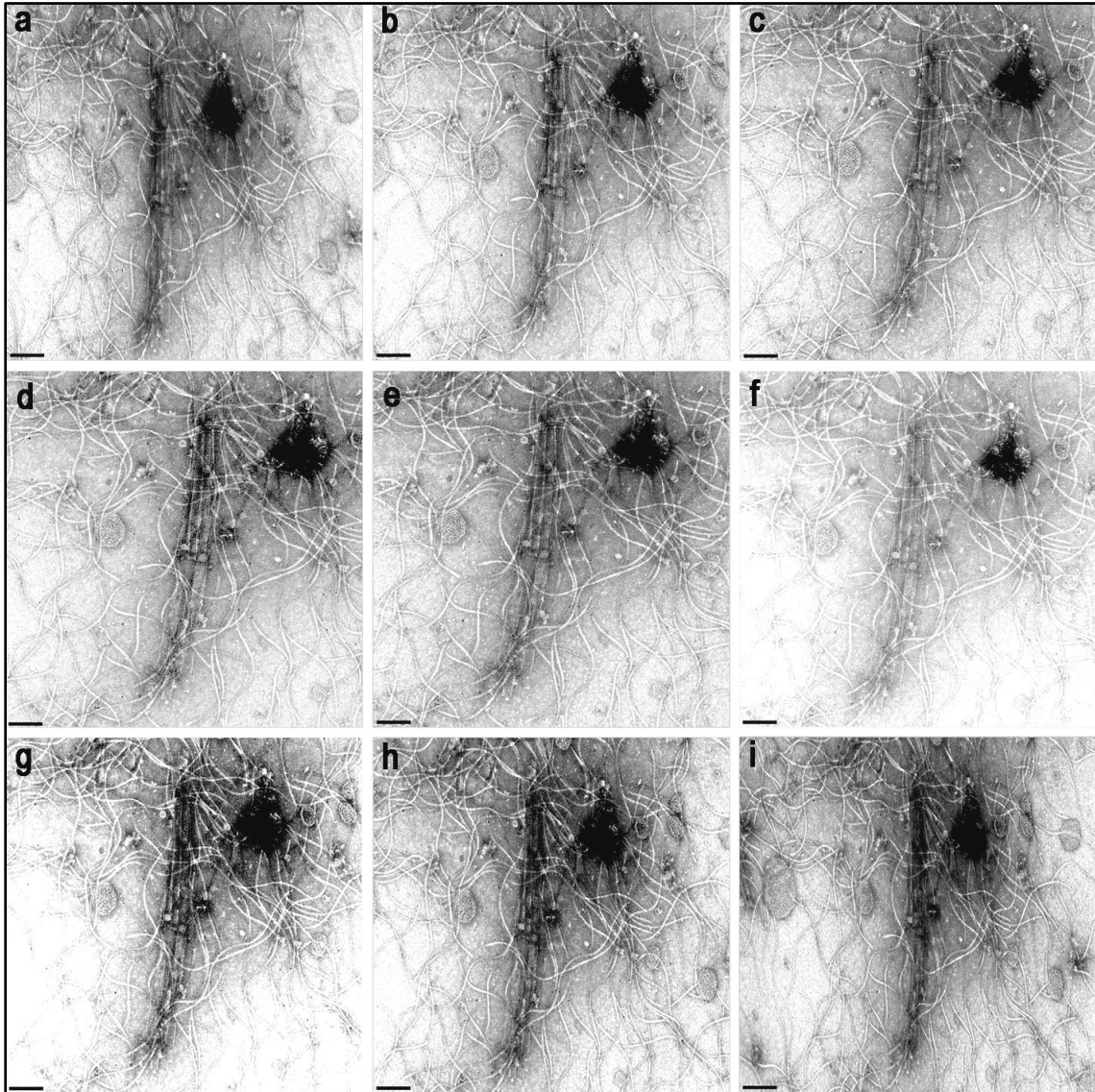
Stoffkonzentrationsgradienten werden bei Bakterien durch sogenannte Methyl-akzeptierende Chemotaxisproteine (MCPs) wahrgenommen. MCPs sind membrandurchspannende dimere Proteine, die sich aus einer Ligand-Bindedomäne (Sensor) im Periplasma und einem Response-Regulator im Cytoplasma zusammensetzen (Sourjik und Armitage, 2010). Eine derartige membrandurchspannende Anordnung von Komplexen konnte auch in den Ultradünnschnitten von *P. furiosus* in der Polregion der Zellen beobachtet werden. (Abb. 3-22 a+c, schwarze Rechtecke).

#### 3.4.4 Tomographie der *Tubes*

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den *Tubes* um röhrenförmige Gebilde handelt, wurde eine dreidimensionale Rekonstruktion der Strukturen angestrebt. Vor der Aufzeichnung der Kippserie war das Präparat zur späteren Alignierung der Einzelbilder mit kolloidalem Gold belegt worden. Im TEM wurde eine Serie von 23 Einzelbildern bei verschiedenen Kippwinkeln aufgenommen, welche sich nach dem Saxton-Schema richteten (Saxton et al., 1984). Verwendet wurde eine geeignete Stelle aus einem Suspensionspräparat einer *Tubes*-Fraktion, bei der drei *Tubes* mit „Einschlüssen“ nebeneinander lagen und von zahlreichen Flagellen flankiert wurden (Abb. 3-23).

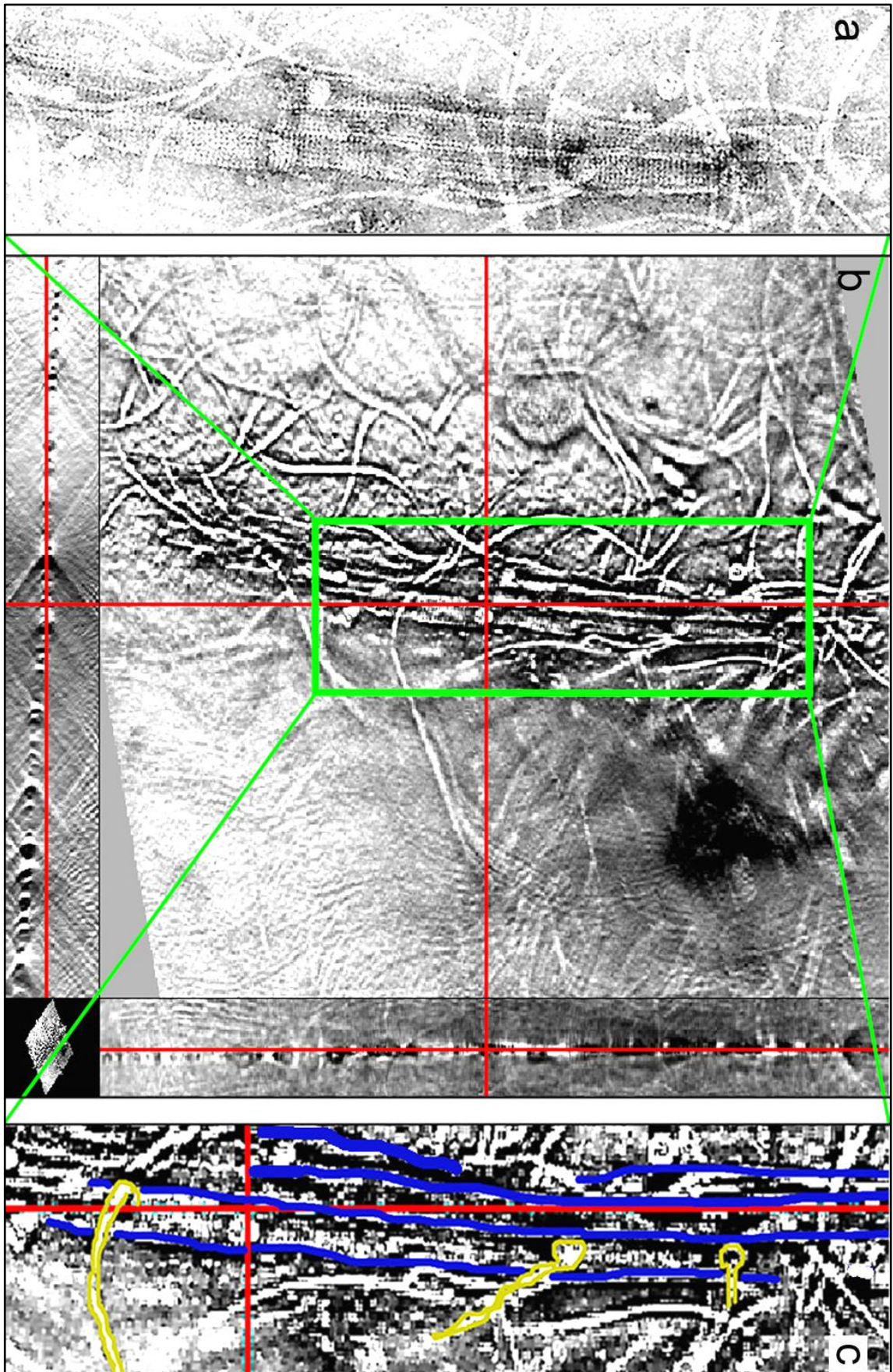
Aus den Daten der Einzelbildserie konnte mit dem Programm TOM-Toolbox ein Bildstapel im avi-Format generiert werden. Dieser befindet sich auf der Begleit-CD und kann als *Movie* mit gängigen Media-Playern abgespielt werden. Abb. 3-24 zeigt mittig (b) einen *Screenshot* aus dem *Movie*, in dem das Präparat sich gerade in Kippung befindet. Zur besseren Veranschaulichung ist links (Abb. 3-24 a) das Einzelbild des Präparates bei einem Kippwinkel von 0° dargestellt. Die Abbildung rechts (Abb. 3-24 c) gibt die Vergrößerung eines interessanten Bereiches aus dem *Screenshot* wieder. Hier sind die Wandung der *Tubes* in blau, sowie drei Flagellen mit endständigen „knöpfchenartigen“ Strukturen in gelber Farbe skizziert. Trotz schlechter Auflösung ist erkennbar, dass die Knöpfchen, die potentielle Verankerungsstrukturen sein könnten, mit dem rechten *Tube* assoziiert sind und scheinbar „in“ ihm liegen. Die dreidimensionale Rekonstruktion zur Darstellung hohler Strukturen mit dem Programm Amira war aufgrund des hohen Hintergrundrauschens jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund fehlt der definitive Beweis, dass die *Tubes* Röhren sind, die an der Flagellenverankerung beteiligt sein könnten. Bessere Resultate könnten erzielt werden, indem eine Tomographie an Ultradünnschnitten durchgeführt wird.





**Abbildung 3-23:** Auszüge aus der Kippserie der *Tubes* bei eingestellten Kippwinkeln von a: 54,05°; b: 42,23°; c: 27,83°; d: 11,41°; e: 0°; f: -17,05°; g: -27,82°; h: -42,23°; i: -54,03°. Größenstandard je 200 nm. Kontrastierung mit UAc.





**Abbildung 3-24: Rekonstruktion der Tubes.** Darstellung eines Screenshots des Präparates in der Kippung (b); der grün markierte Bereich ist als Suspensionspräparat bei einem Kippwinkel von 0° dargestellt (a) und als vergrößerter Bereich (c); hier sind die Wandungen der Tubes in blau skizziert, Flagellen mit endständigen „Knöpfchen“ in gelb.

### 3.5 Charakterisierung der Flagellen

#### 3.5.1 Bioinformatische Analysen

Es ist bekannt, dass die Flagellen von *P. furiosus* aus drei glykosilierten Strukturproteinen, den Flagellinen FlaB0, FlaB1 und FlaB2 aufgebaut sind, wobei FlaB0 erst kürzlich identifiziert wurde (Näther, 2007). Unklar ist jedoch, wie und in welcher Menge die Flagelline im Filament verteilt sind. Frühere Daten sprachen für FlaB0 als Hauptflagellin (Näther et al., 2006), wohingegen durch neuere Analysen FlaB2 zusätzlich mit in Frage kommt (Zach, 2009). Auch über die Ankerstruktur und den archaeellen Motor ist wenig bekannt. Für *P. furiosus* waren bislang lediglich knopfartige flagellenendständige Strukturen beschrieben worden, die an der Verankerung beteiligt sein könnten (Näther, 2007). In Tabelle 3-4 sind einige (bioinformatische) Daten zu den drei Flagellinen zusammengestellt.

<b>Flagellin</b>	<b>Molekulare Masse [Protpram]</b>	<b>*Glykosylierungsstellen [NetNGlyc]</b>	<b>Signalpeptid [FlaFind 1.0, SignalP 3.0]</b>	<b>Transmembranhelices/Anzahl [TMHMM, Phobius]</b>	<b>Zelluläre Lokalisation [PSORTb]</b>	<b>**Identifikation</b>
FlaB0	22,3 kDa	4	ja	Ja/1	extrazellulär	Maldi, NTS, WB
FlaB1	22,6 kDa	3	ja	Ja/1	extrazellulär	Maldi, WB°, IM°
FlaB2	28,8 kDa	3	ja	Ja/1	extrazellulär	Maldi, WB°, IM°

**Tabelle 3-4: Bioinformatische Analyse der drei Strukturflagelline von *P. furiosus* anhand verschiedener Vorselektionsprogramme.** Die Programme stehen jeweils in eckigen Klammern. \*wahrscheinliche Besetzung von Glykosylierungsstellen mit der Sequenz N-X-S/T; \*\*Maldi: MALDI-TOF MS/MS; NTS: N-terminale Sequenzierung durch Edman-Abbau; WB: Westernblot; IM: Immunmarkierung im TEM; °in dieser Arbeit durchgeführt.

Vor allem die Flagelline FlaB0 und FlaB1 weisen eine ähnliche theoretische molekulare Masse auf, die sich hier jeweils auf das unglykosilierte Protein bezieht. Ein Hinweis auf eine Glykosylierung der Flagelline konnte indirekt über PAS-Färbung erbracht werden (Näther, 2007), die Analyse der Zusammensetzung der Zucker steht jedoch noch aus. Jedes der drei Flagelline besitzt potentielle Stellen für eine N-Glykosylierung, die anhand der bei Archaeen gültigen Sequenz N-X-S/T bestimmt werden konnten. Die Zahl der ermittelten Glykosylierungsstellen, die für FlaB0 und FlaB1 bei fünf, für FlaB2 bei sechs liegt, muss aber nicht zwangsläufig identisch sein mit der Zahl der potentiell besetzten Stellen. Das Vorhandensein der Sequenz ist kein hinreichendes Kriterium für eine Glykosylierung durch das Enzym Oligosaccharyltransferase, da für die Besetzung der Stelle im Protein weitere Bedingungen erfüllt sein müssen.



```

FLAB0      MAKKGAVGIGTLIVFIAMVLVAAVAAVLIQTSGYLQQKSQATGAETTQEVASGIKVLVS 60
FLAB1      MAKKGAVGIGTLIVFIAMVLVAAVAAVLIQTSGYLQQKSQATGAETTQEVASGIKVLVS 60
FLAB2      -MKKGAIIGTLIVFIAMVLVAAVAGVLIATSGYLQQKAMATGRQTTQEVASGIKVTGV 59
          ***:*****.*** *****: *** :***** .*

FLAB0      VG---KIDSNKTYVEKLAIYISPNAGSEQIDLNNTRVVLNNGTVQAVLKYEKT----- 110
FLAB1      VG---KIDSNKTYVEKLAIYISPNAGSEQIDLNNTRVVLNNGTVQAVLKYEKT----- 110
FLAB2      FGYINGTFPGASNISRIVIVAPNAGSSGIDLRVYKIVLSDGKRMAVYRYYPDKEDGSSD 119
          .*      * .. : :.:.***:****. **, .:***:*. ** * * ..

FLAB0      -----AYHKGAVGDVFN-----ASTAWNLSNTN----- 133
FLAB1      -----AYHKGAVGDVFN-----ASTAWNLSNTN----- 133
FLAB2      LKPEYIHYKGDIPNIFAYGEWEPYKKNKKPQISGEYITDNINVSAVWNNLYSAYNNSSKL 179
          ::* : :.*                               :.. *** .:

FLAB0      -FGIIVLQDADNSV-DQNYPTLNKGDIVVITVKVG---EGNGVFGKGIPPRTKITGKVI 187
FLAB1      -FGIIVLQDADNSV-DQNYPTLNKGDIVVITVKVG---EGNGVFGKGIPPRTKITGKVI 187
FLAB2      LFGIAVVQDGDNSLSDPQHPTLSWGDLAALMIWTFPFDDNNISNGFGLRPGTKIIGKVI 239
          *** *:*.***: * :*:*. **:.. : : . :.* * *: * ** * ***

FLAB0      PEFQAPGVIEFTTPSTYTSEVIELQ 212
FLAB1      PEFQAPGVIEFTTPSTYTSEVIELQ 212
FLAB2      PESGAAGVIDFTTPSTYTQNLMLQ 264
          ** * ***:*****.:*:**

```

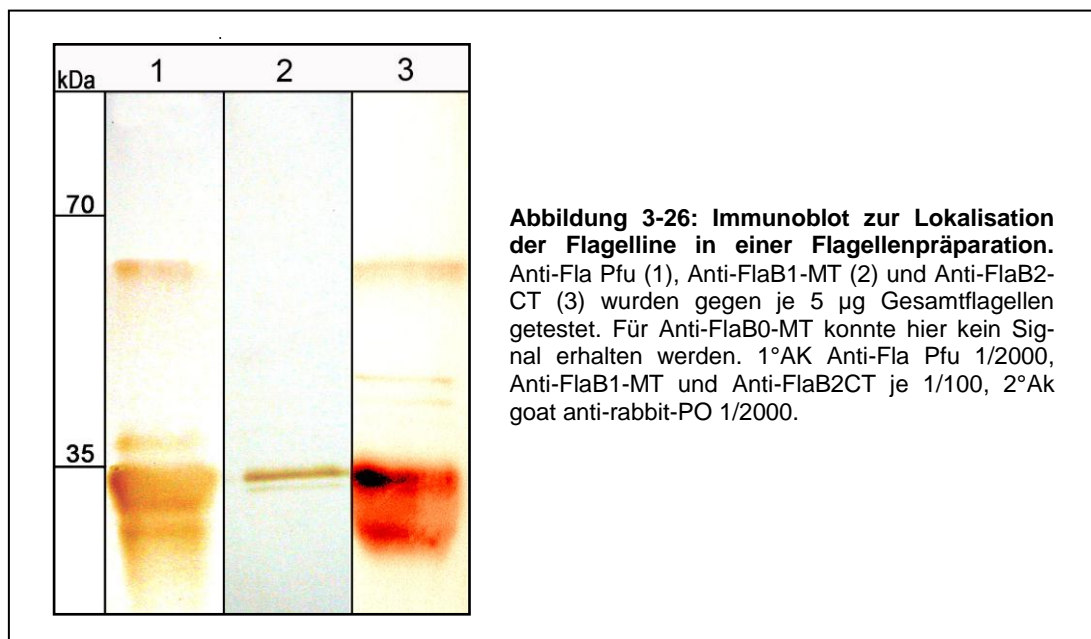
95

### 3.5.2 Analyse durch immunologische Methoden

Zur Klärung der Frage, wie die einzelnen Flagelline im Filament verteilt vorliegen, wurde auf immunologische Methoden zurückgegriffen. Dazu standen verschiedene Antikörper zur Verfügung, die in vorangegangenen Arbeiten hergestellt worden waren: Ein Antikörper gegen die Gesamtflagellen (Anti-Fla Pfu), sowie Antikörper gegen rekombinant erzeugte Flagelline, wobei hier jeweils nur der Mittelteil (MT) oder der C-Terminus (CT) exprimiert worden war (Näther, 2007; Wimmer, 2007). Zum besseren Verständnis sind in Tabelle 3-5 die Aminosäurepositionen der jeweiligen Teilbereiche aufgelistet. Die N-terminalen Regionen wurden aufgrund der bereits erwähnten Sequenzidentitäten ausgespart, um Kreuzreaktionen der Immunglobuline vorzubeugen. Im Immunoblot wurden je 5 µg Protein aus einer Flagellen- und einer *Tubes*-Fraktion (vgl. Fraktionen Nr. 5 und 4 in Abb. 3-17) auf eine PVDF-Membran übertragen und alle verfügbaren Antikörper auf eine Bindung hin getestet. Die Antikörper gegen die rekombinanten Proteine wiesen einen niedrigen Titer auf und mussten deswegen wenig verdünnt eingesetzt werden. Im Fall der Flagellenpräparation konnten positive Signale mit dem Antikörper gegen Gesamtflagellen (Anti-Fla Pfu), sowie mit Anti-FlaB1-MT und Anti-FlaB2-CT mit Hilfe eines Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers detektiert werden (Abb. 3-26). So waren bei Verwendung von Anti-Fla Pfu und Anti-FlaB2-CT eine deutliche rotbraune Doppelbande auf einer Höhe von in etwa 30-35 kDa, sowie eine weitere Bande bei 60 kDa vorhanden. Beim Einsatz von Anti-FlaB1-MT als Primärantikörper wurde nur eine Bande bei 35 kDa sichtbar. Das Auftreten der Doppelbande bei ca. 30-35 kDa lässt sich höchstwahrscheinlich durch das gleichzeitige Vorhandensein der glykosilierten und unglykosilierten Formen der Flagelline erklären, was auch mit MALDI-TOF MS/MS Analysen im Einklang steht. Hier konnte gezeigt werden, dass alle drei Flagelline Bestandteil der Doppelbande sind (Zach, 2009). Die Bande bei ca. 60 kDa repräsentiert vermutlich das Dimer eines Flagellins. In der *Tubes*-Fraktion reagierten nur Anti-Fla Pfu und Anti-FlaB1-MT positiv. Der Antikörper gegen die Gesamtflagellen markierte wiederum die Doppelbande und die bei 60 kDa, wohingegen letzter genannter Antikörper nur an eine Bande bei ca. 30 kDa band (Daten nicht gezeigt). Für das Antiserum gegen den Mittelteil von FlaB0 (Anti-FlaB0-MT) trat in keinem der getesteten Fälle eine positive Reaktion auf.

Teilbereich des Flagellins	Aminosäurepositionen	Anzahl der Aminosäuren
FlaB0 Mittelteil	107-173	66
FlaB1 Mittelteil	109-174	65
FlaB2 Mittelteil	109-170	61
FlaB2 C-Terminus	171-264	93

**Tabelle 3-5: Zusammenstellung der Aminosäurepositionen der Teilbereiche von FlaB0, FlaB1 und FlaB2, gegen welche Antikörper generiert wurden.**

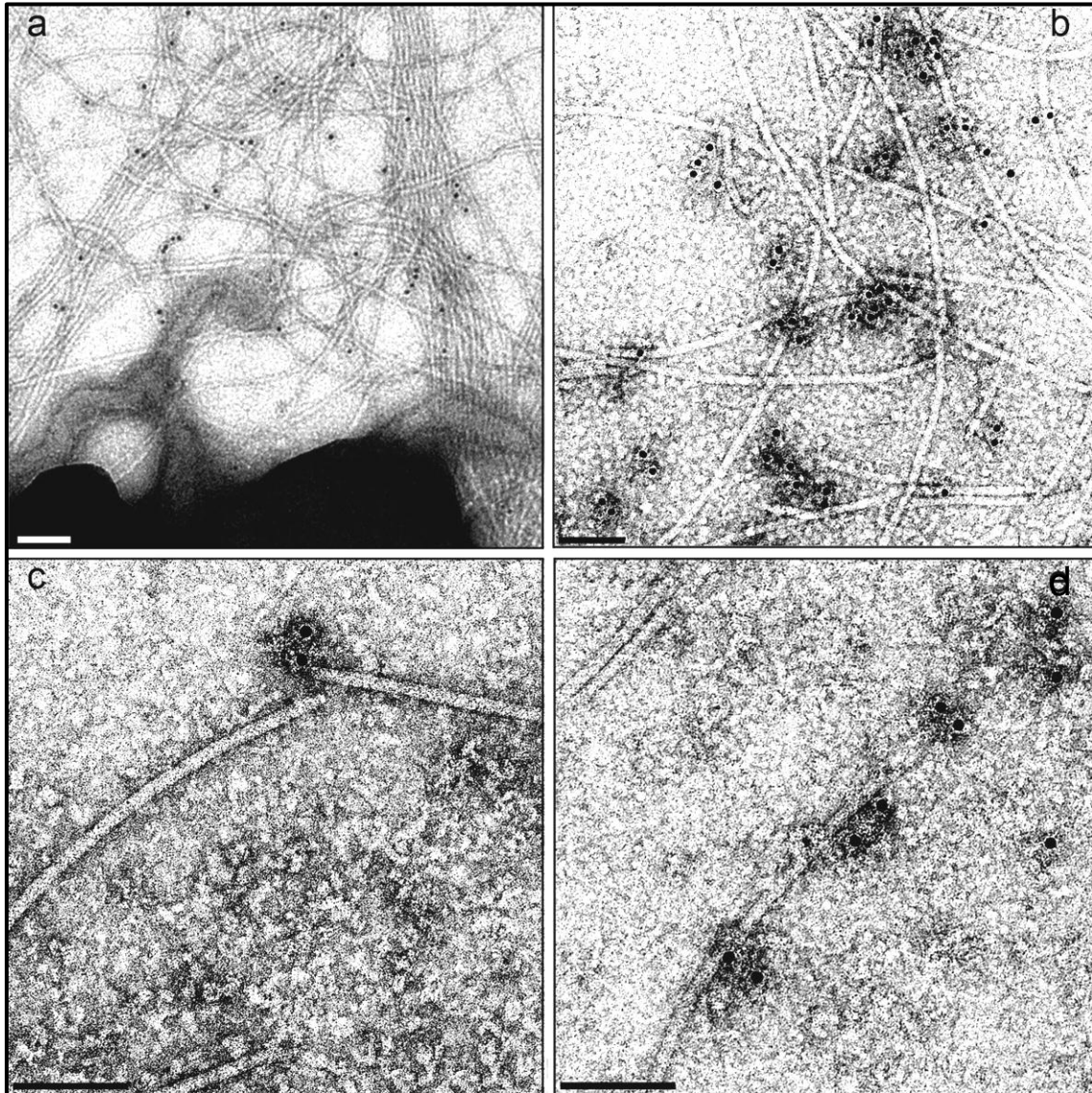


Für Immunlokalisationsexperimente im TEM wurden Suspensionspräparate von Flagellen- und Tubes-Fraktionen, sowie Präparate adhärierender *P. furiosus*-Zellen auf Goldgrids hergestellt. Alle primären Antikörper gegen die rekombinant erzeugten Flagellinteilbereiche, sowie der gegen die Gesamtflagellen (Anti-Fla Pfu) wurden auf eine Bindung an die Flagellen hin untersucht. Diese konnte über einen sekundären goldgekoppelten Antikörper als schwarze Körner (Durchmesser 6 oder 10 nm) auf hellerem Hintergrund visualisiert werden. So konnte die Markierung der Zellanhänge adhärenter *P. furiosus*-Zellen durch Anti-Fla Pfu dargestellt werden (Abb. 3-27 a). Für alle anderen verfügbaren Antikörper konnte keine eindeutige Markierung an den Flagellen festhaltender Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die adhärenenden *P. furiosus*-Zellen wurden in einem weiteren Versuchsansatz durch eine Trocknung bei RT oder 140°C für 30 min fixiert, um den Antikörpern so potentiell unzugängliche Epitope präsentieren zu können. Durch die Fixierung wurden die Zellen und die Flagellen jedoch in so hohem Grade zerstört, dass über die Bindung eines Antikörpers an bestimmte Strukturen keine Aussage mehr getroffen werden konnte. Deutlich bessere Ergebnisse wurden mit Suspensionspräparaten von Fraktionen aus dem CsCl-Gradienten erzielt. Hierbei wurde auf die Tubes- und die Flagellenfraktion (vgl. Fraktionen Nr. 4 und 5 in Abb. 3-17) zurückgegriffen. Für Anti-FlaB2-MT (Abb. 3-27 b) und Anti-FlaB1-MT (Abb. 3-27 c+d) konnte eine Bindung der IgGs an die Filamente gezeigt werden. In einigen Fällen konnte für Anti-FlaB1-MT eine Markierung am Ende der Flagellen beobachtet werden. Bemerkenswert ist, dass die häufig in den Fraktionen beobachteten Strukturen, wie die Tubes und die ringförmigen Proteine in den Präparaten nicht mehr in dieser Form vorhanden waren.



Vielmehr schienen die Strukturen im Verlauf der Immunmarkierung zerfallen zu sein, was den „Hintergrund“ in den TEM-Präparaten erklärt. Auch von den Flagellen waren vorwiegend Bruchstücke erhalten geblieben. Für Anti-FlaB0-MT konnte wiederum in keinem der getesteten Fälle eine Markierung nachgewiesen werden.



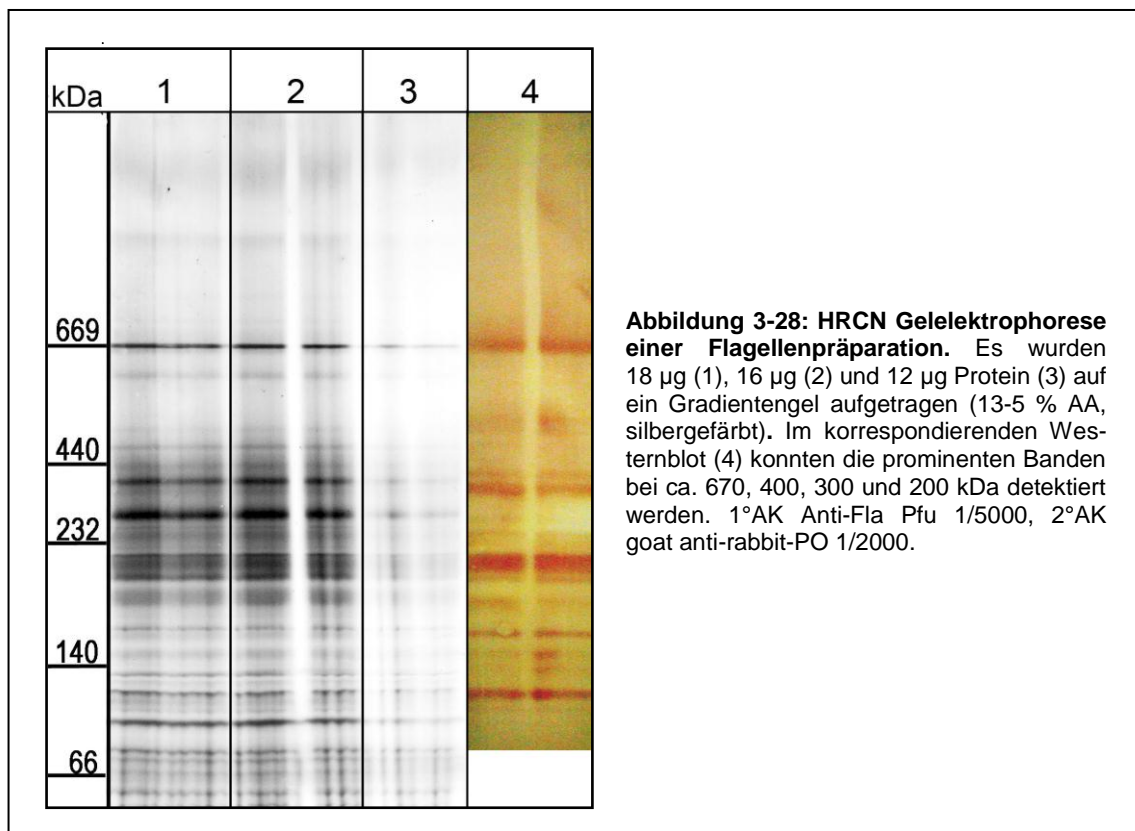
**Abbildung 3-27: Immunogoldlabeling im TEM.** a: *P. furiosus*-Zellen, die auf Goldgrids gewachsen sind (1°AK Anti-Fla Pfu); b: Fraktion Nr. 5 aus dem CsCl-Gradienten (1°AK Anti-FlaB2-MT); c+d: Fraktion Nr. 4 aus dem CsCl-Gradienten (1°AK Anti-FlaB1-MT); 1°AK jeweils 1/100, 2°AK goat anti-rabbit+10 nm Gold-partikel 1/50. Größenstandard 100 nm. Kontrastierung mit UAc.

#### 3.5.3 Analyse über native Gelelektrophorese

Proteine, die aus einem CsCl-Gradienten als Flagellenfraktion isoliert werden konnten, wurden im gefalteten Zustand im Gel aufgetrennt, um den Oligomerisierungsgrad und die Bildung von Proteinkomplexen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde eine *High Resolution Clear Native* (HRCN) Gelelektrophorese (Wittig et al., 1997) durchgeführt, bei der man im Gegensatz zur *Blue Native Gelelectrophoresis* (BNG) auf die Zugabe des anionischen Farbstoffes Coomassie Blue G-250 verzichtet. Um eine gute Auftrennung der Proteinkomplexe zu erreichen, wurde ein Gradientengel mit einer nach oben hin kontinuierlich abnehmenden Acrylamidkonzentration (13-5 % AA, v/v) verwendet. Von der Proteinlösung wurden unterschiedliche Mengen auf das Gel aufgetragen, welches zur Visualisierung der Proteinbanden nach der Elektrophorese einer Silberfärbung unterzogen wurde. Ein spezieller Standard, der für die native Gelelektrophorese geeignet ist, gab Aufschluss über die Größe der vorhandenen Banden. Wie in Abb. 3-28 (Spuren 1-3) dargestellt ist, konnten eine Vielzahl von Banden detektiert werden, wobei die prominenten Proteine ein Molekulargewicht von ca. 670, 400, 300 und 200 kDa besaßen.

Durch den Transfer der Proteine auf eine Membran mit Hilfe des Drei-Puffer-Verfahrens nach Khyse-Anderson (1984) mit anschließender Immunodetektion wurde überprüft, inwiefern es sich dabei um Oligomere der Flagelline handeln könnte (Abb. 3-28, Spur 4). Zu diesem Zweck wurde als primärer Antikörper der gegen die Gesamtflagellen gerichtete verwendet (Anti-Fla Pfu). Über einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper konnten die beschriebenen prominenten Banden aus dem Silbergel, neben weiteren, im Westernblot als rot-braune Banden detektiert werden. Durch diesen Befund konnte gezeigt werden, dass die Flagellen im nativen Gel in zahlreiche Oligomere aufgetrennt werden.

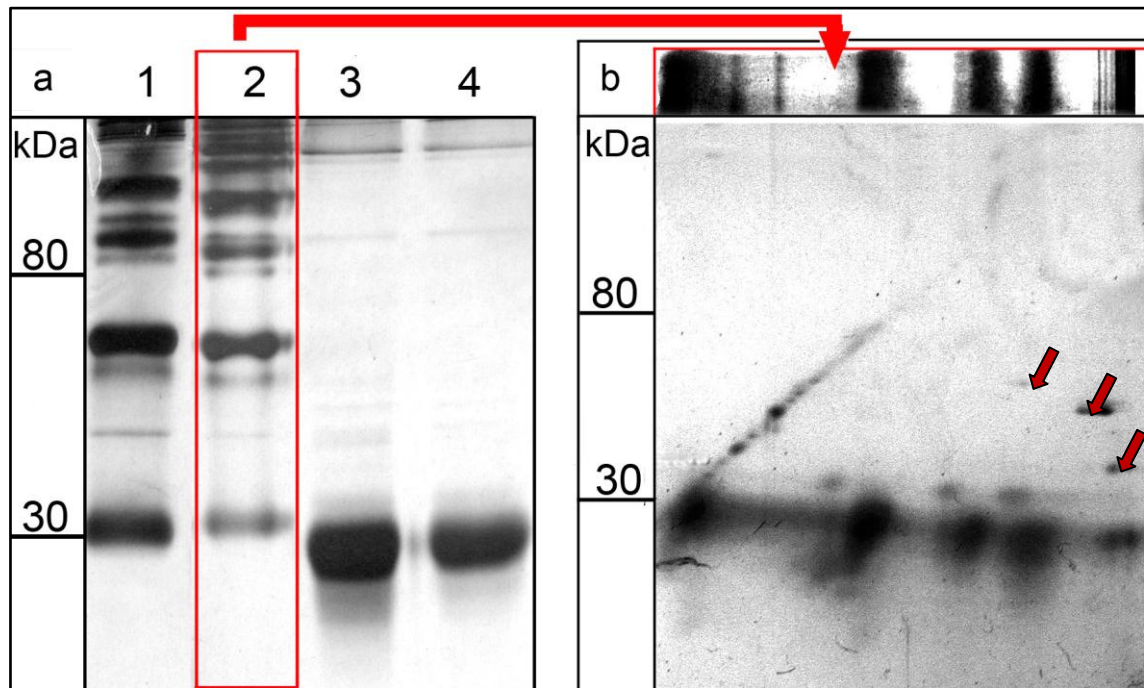




#### 3.6 De- und Repolymerisationsversuche an Flagellen von *P. furiosus*

##### 3.6.1 Depolymerisation der Flagellen

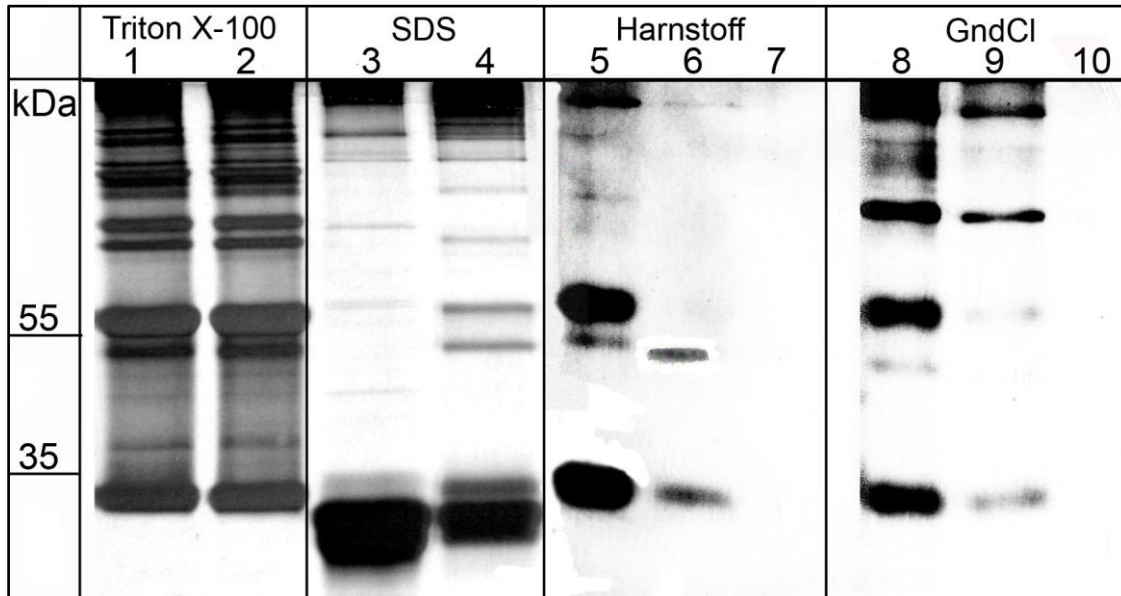
Zur Zerlegung der Flagellen in ihre Einzelbestandteile wurde die Wirkung verschiedener Detergenzien und chaotroper Agentien, sowie der verwendeten Inkubationstemperatur auf die Struktur der Zellanhänge untersucht. Für alle Versuche wurden Flagellen verwendet, die wie unter 2.14 beschrieben, durch Solubilisierung mit DDM aus 1-2 l Kultur gewonnen werden konnten. Pro Versuchsansatz wurden dabei 5 µg Protein eingesetzt. Das anionische Detergenz SDS wurde aufgrund einer standardisierten Methode (Näther, 2007) zur Analytik der Flagellen bei der SDS-Gelelektrophorese verwendet. Durch Kochen der Proben in einem Auftragspuffer mit 2 % SDS (w/v) und 5 % β-Mercaptoethanol (v/v) bei 100°C für 10 min konnten die Zellanhänge in ihre Monomere zerlegt werden, die im Gel als entsprechende Banden bei ca. 30 kDa auftraten. Der Einfluss von SDS (1 % Endkonzentration, w/v) wurde genauer untersucht, indem Proben auch bei RT mit und ohne Zugabe von β-Mercaptoethanol für 1 h inkubiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Filamente auf diese Weise nicht vollständig in die Monomere zerlegt werden konnten, was unabhängig von der Zugabe von β-Mercaptoethanol war (Abb. 3-29 a, Spur 1+2). Erst durch ein Erhitzen auf 100°C gelang die vollständige Depolymerisation der Zellanhänge, was sich durch eine einzelne Bande bei ca. 30 kDa zeigte und wiederum unabhängig von der β-Mercaptoethanol-Zugabe war (Abb. 3-29 a, 3+4). Aus diesem Befund wurde gefolgert, dass Flagellen bei Verwendung von SDS nur durch eine gleichzeitige Kombination mit Hitze zerlegt werden konnten. Dieses Resultat wurde durch eine zweidimensionale SDS-PAGE bestätigt, wobei die gewählten zwei Dimensionen sich in der Art der Probendenaturierung unterschieden. In der „1. Dimension“ wurde eine Flagellenpräparation durch einstündige Behandlung mit 1 % SDS bei RT in Monomere und Oligomere zerlegt (entspricht Spur Nr. 2 aus Abb. 3-29 a). Diese Gelspur wurde ausgeschnitten und bei 100°C für 10 min in einem Auftragspuffer mit 2 % SDS aufgekocht. Diese nun als „2. Dimension“ bezeichnete Gelspur wurde in eine weitere Gelelektrophorese eingesetzt und die Proteine erneut aufgetrennt. Wie aus dem Resultat in Abb. 3-29 b ersichtlich ist, konnten die Oligomere so in die Monomere bei 30 kDa überführt werden. Zusätzlich konnten wesentlich schwächere Banden im höhermolekularen Bereich bei ca. 35-45 kDa detektiert werden (rote Pfeile). Sie stellen Indizien für das Vorhandensein von weiteren Proteinen neben den Flagellinen FlaB0, FlaB1 und FlaB2 dar.



**Abbildung 3-29: Einfluss von SDS auf die Struktur von Flagellen.** a: Denaturierung mit 1 % SDS (Endkonzentration, w/v) für 1 h bei RT mit (1) und ohne (2)  $\beta$ -Mercaptoethanol, sowie für 10 min bei 100°C mit (3) und ohne (4)  $\beta$ -Mercaptoethanol. b: 2D-Gelelektrophorese; Denaturierung mit 1 % SDS (Endkonzentration, w/v) für 1 h bei RT (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol, entspricht Spur 2 aus a) in der ersten Dimension und in der zweiten mit 2 % SDS (Endkonzentration, w/v) bei 100°C für 10 min. SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt).

Neben SDS wurde auch die Wirkung von Triton X-100, Harnstoff und Guanidinhydrochlorid auf die Struktur der Flagellen untersucht. Die Zellanträge wurden mit der entsprechenden Chemikalie (in verschiedenen Endkonzentrationen) versetzt und zuerst 1 h bei RT, anschließend 10 min bei 100°C inkubiert. Zur Analyse der Proben wurde SDS erst unmittelbar vor der Gelelektrophorese zugegeben, um das Versuchsergebnis nicht zu verfälschen. Das Auftreten von mehreren Banden, neben der bei 30 kDa, implizierte, dass die Zellanträge mit Triton X-100, Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid (Abb. 3-30, Spuren 1, 2, 5-10) nicht vollständig in die monomere Form überführt werden konnten. Die Proben, welche mit 5 M Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid behandelt worden waren, liefen nicht in das Trenngel ein, sondern verblieben im Sammelgel, so dass eine Auswertung der Banden im SDS-Gel nicht möglich war (Abb. 3-30, Spuren 7+10). Das in dieser Versuchsreihe zur Depolymerisation der Flagellen beste Ergebnis wurde wiederum bei der Verwendung von 1 % SDS erzielt (w/v; Abb. 3-30, Spur 3).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen aller in Abb. 3-30 gezeigten Proben ergaben, dass die Filamente nur in der mit SDS (1 %, w/v) behandelten komplett in ihre Bausteine zerlegt worden waren (Daten nicht gezeigt). Damit konnte erneut bestätigt werden, dass die geeignetste Methode zur Monomerisierung von Flagellen eine Behandlung mit dem anionischen Detergenz in Kombination mit Erhitzen war. Aus diesem Grund wurden Flagellen zur Depolymerisation mit 1 % SDS (w/v) versetzt und 10 min bei 100°C aufgekocht.



**Abbildung 3-30: Depolymerisation von Flagellen.** Behandlung einer Flagellenpräparation mit Triton X-100 (1+2) und SDS (3+4) in einer Endkonzentration von 1 % (1 bzw. 3) und 0,1 % (2 bzw. 4), sowie mit 1,5 M, 3 M, 5 M Harnstoff (5, 6, 7) und 1 M, 3 M, 5 M Guanidiniumhydrochlorid (8, 9,10) für 1 h bei RT. Die Proben wurden anschließend 10 min auf 100°C erhitzt und auf einem SDS-Gel analysiert (12,5 % AA, silbergefärbt).

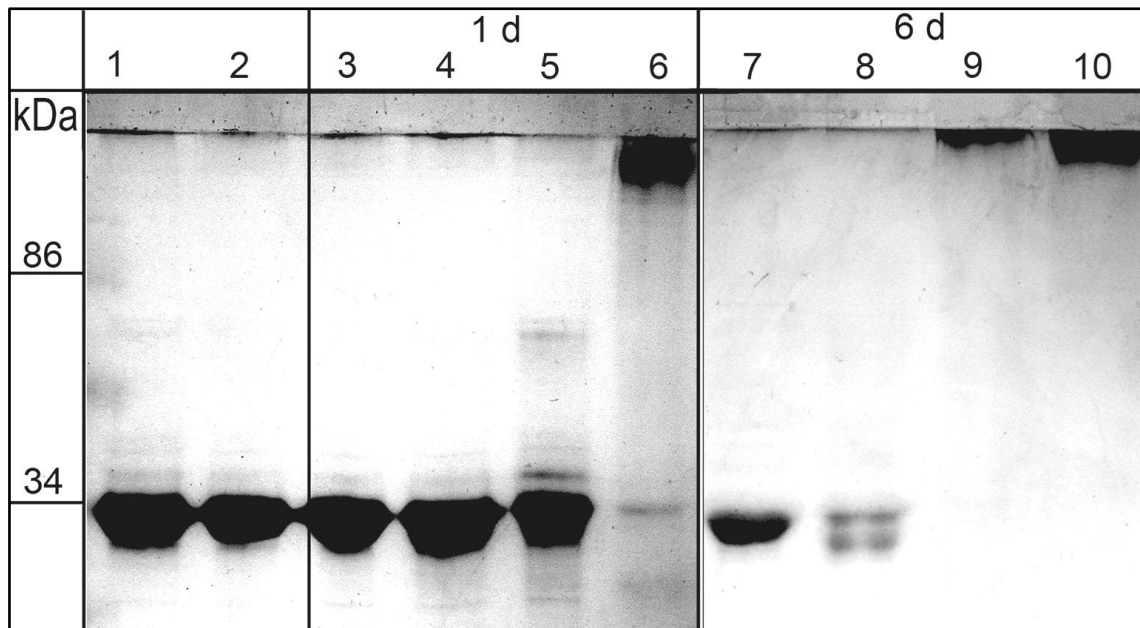
### 3.6.2 Studien zur Repolymerisation

In mehreren Versuchsansätzen wurden Bedingungen getestet, die zur Repolymerisation von Flagellen führen könnten. Eine Voraussetzung dafür war, dass die Experimente mit komplett in ihre Untereinheiten zerlegten Flagellen durchgeführt wurden. Dazu wurden die Filamente, wie oben erläutert, mit SDS und Hitze behandelt. Im nachfolgenden Schritt wurden die Proben intensiv durch viermaligen Pufferwechsel gegen 5 mM HEPES (pH-Wert 7,0) dialysiert, um die SDS-Konzentration herabzusetzen. Anschließend wurden Ansätze bei vier verschiedenen Temperaturen (8°, 37°, 60° und 90°C) inkubiert und ihnen nach 1, 2 und 6 Tagen Aliquots zur Analytik auf einem Gel und im TEM entnommen. Bei der Vorbereitung für die SDS-PAGE wurden die Proben nicht aufgeköcht und SDS erst kurz vor dem Start der Gelelektrophorese hinzugefügt, um falsche Versuchsergebnisse durch den Zerfall der Flagellen zu vermeiden.

Bei der Auswertung der Experimente über SDS-PAGE wurden die Proben nach der Denaturierung und nach der Dialyse aufgetragen, wobei durch die deutliche Bande bei 30 kDa gezeigt werden konnte, dass die Flagellen als Monomere vorlagen (Abb. 3-31, Spuren 1+2). Bereits nach eintägiger Inkubation konnte im 90°C-Ansatz eine Veränderung im Laufverhalten der Proteine detektiert werden. Hier trat ein Bandenshift hin zum hochmolekularen Bereich auf, wobei die prominente 30 kDa-Bande, welche die Monomere der Flagellen repräsentierte, durch eine Bande knapp unterhalb der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel ersetzt wurde. Auch im 60°C-Ansatz war neben der dominierenden Bande bei 30 kDa eine deutlich schwächere bei



60 kDa vorhanden (Abb. 3-31, Spur 5). Diese beiden Banden waren nach zwei Tagen Inkubation vollständig verschwunden und nur noch eine hochmolekulare knapp unterhalb der Grenze zum Sammelgel präsent (Daten nicht gezeigt). Das Migrationsverhalten der Proteine im Gel deckte sich mit dem nach sechstägiger Inkubationsdauer (Abb. 3-31, Spuren 9+10). Zusätzlich konnte hier ein beginnender Bandenshift im 37°C-Ansatz detektiert werden.

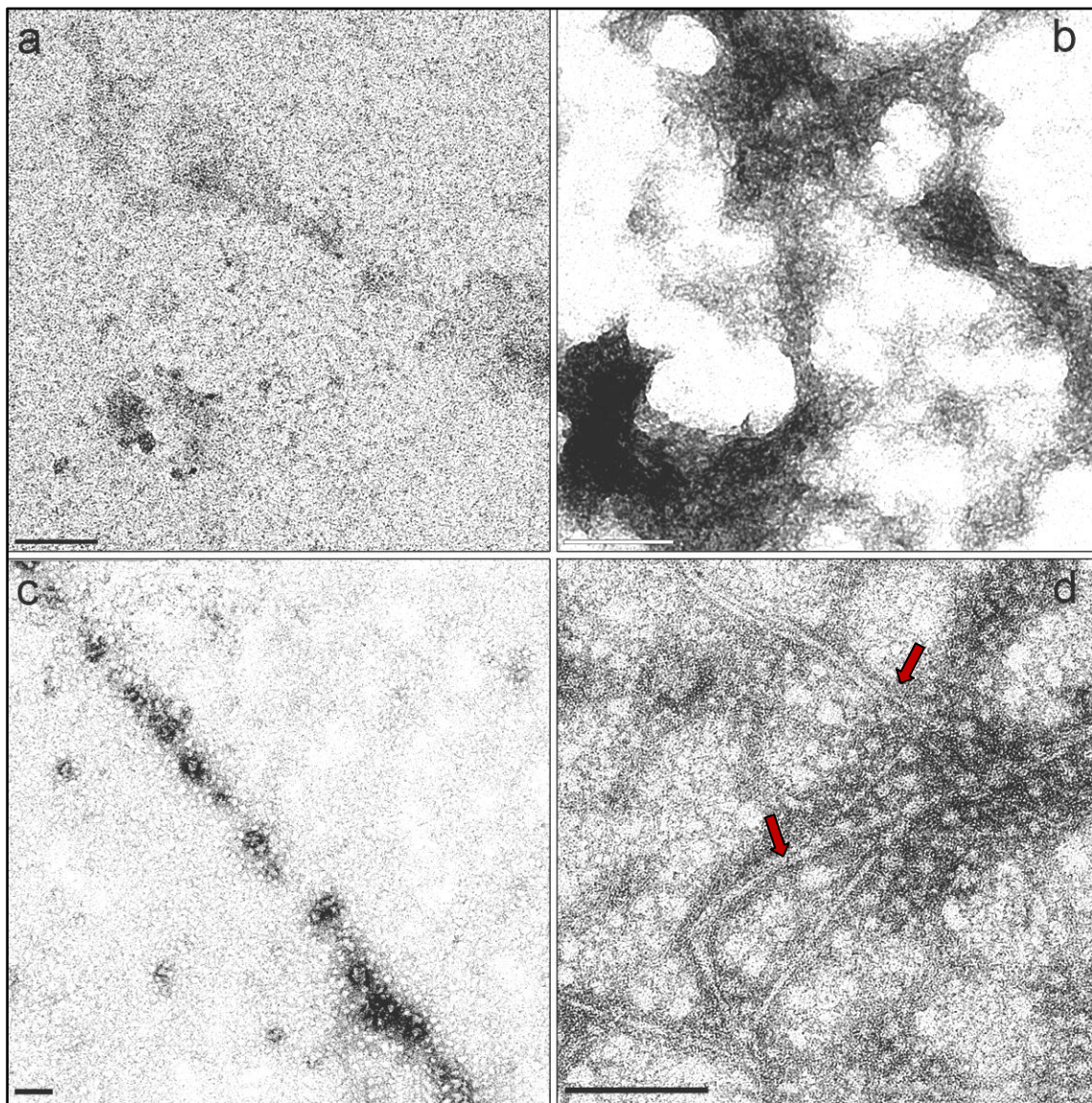


**Abbildung 3-31: Repolymerisationsversuche an Flagellen.** Darstellung der Monomere nach der Denaturierung mit SDS (1) und nach der Dialyse (2). Aliquots der Temperaturansätze, die nach 1 d (3-6) und 6 d (7-10) Inkubation entnommen und über SDS-PAGE analysiert wurden (12,5 % AA, silbergefärbt). Inkubation bei 8°C (3+7), 37°C (4+8), 60°C (5+9) und 90°C (6+10).

Da die Repolymerisation von Flagellen ein Prozess sein könnte, der nicht völlig spontan abläuft, sondern die Zugabe von Energie erfordert, wurden die Repolymerisationsexperimente unter Zugabe von 1 mM ATP (Endkonzentration, w/v) wiederholt. Wegen seiner schnellen Hydrolyse wurde das ATP täglich erneut zu jedem Temperaturansatz hinzugefügt. Nach einem Tag Inkubation war das Bandenmuster im SDS-Gel vergleichbar zu dem ohne ATP-Zugabe (siehe Abb. 3-31). Auch hier trat bei der 90°C-Probe der Shift der 30 kDa-Bande zum hochmolekularen Bereich auf. Ähnlich vergleichbar war das Migrationsverhalten der Proteine nach zwei- und sechstägiger Inkubation, so dass kein Einfluss von ATP auf die Repolymerisation ermittelt werden konnte.

Ein wichtiges Werkzeug zur Analyse einer potentiellen Repolymerisation war die Mikroskopie der Proben im TEM, um das Vorhandensein von Filamenten zu überprüfen. In den Proben nach der Dialyse waren weder Strukturen, die an Zellanhänge erinnerten, noch Proteinaggregate sichtbar (Abb. 3-32 a), was sich mit dem oben erläuterten Ergebnis aus der Gelelektrophorese deckte.

Ein besonderes Augenmerk wurde wegen des erwähnten Bandenshifts auf die Ansätze bei 60°C und 90°C gelegt. Wie in den Abb. 3-32 b (60°C-Ansatz nach zwei Tagen Inkubation plus ATP) und 3-32 c (90°C-Ansatz nach einem Tag Inkubation ohne ATP) gezeigt ist, lagen in beiden Temperaturansätzen häufig Proteinaggregate vor. Diese waren größtenteils unstrukturiert und ließen kaum eine Assoziation mit Flagellenfilamenten zu. Im letztgenannten 90°C-Ansatz konnten Strukturen gefunden werden, die Ähnlichkeiten zu den Zellanhängen von *P. furiosus* hatten (Abb. 3-32 d, rote Pfeile).



**Abbildung 3-32: Analyse der Repolymerisation von Flagellen im TEM.** Darstellung einer Probe nach erfolgter Dialyse (a), wobei hier keine Filamente vorhanden waren. In einem 60°C-Ansatz (+ATP) nach 2 d Inkubation (b) oder einem 90°C-Ansatz (-ATP) nach bereits 1 d (c) lagen Proteinaggregate vor. In letztgenanntem Ansatz waren auch Flagellen-ähnliche Strukturen vorhanden (d). Größenstandard 100 nm. Kontrastierung mit UAc.



In einer Modifikation der Repolymerisationsexperimente wurden die Flagellen wie beschrieben depolymerisiert und nach der Dialyse mit einer äquimolaren Menge einer S-Layer Präparation von *P. furiosus* versetzt. Die Idee dahinter war, dass Komponenten aus der Zellwand für die Aggregation der Flagelline zum Filament nötig sein könnten. Des Weiteren wurde den Proben ein Puffer mit zweiwertigen Ionen ( $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$ , jeweils 5 mM, pH-Wert 7,0) zur Stabilisierung der Proteine zugegeben. Es wurden zwei parallele Versuchsansätze mit und ohne Zugabe von ATP bei oben beschriebenen Temperaturen durchgeführt. Auch unter diesen Bedingungen wurden die oben erläuterten Bandenshifts in den Ansätzen bei 60°C und 90°C, sowie das Auftreten von Proteinaggregaten beobachtet. Es konnte jedoch weder eine Anreicherung der Filamente, noch eine Verbesserung der Strukturhaltung erzielt werden.

#### 3.7 Klonierung von *flaB0*

Das *flaB0*-Gen ist durch einen hydrophoben und konservierten N-Terminus mit kurzem Signalpeptid gekennzeichnet, der unter Verdacht steht, toxisch für *E. coli*-Expressionsstämme zu sein. Bisher konnte nur die Expression des Mittelteils, der Region mit der höchsten Variabilität unter den Flagellinen (vgl. Alignment Abb. 3-25), erfolgreich durchgeführt werden (Näther, 2007).

Zur Klonierung und Expression des Flagellins wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Expressionssysteme verwendet, die eine induzierbare Kontrolle unter dem starken Promotor des *E. coli* Phagen T7 erlaubten. Es wurden mehrere *E. coli*-Expressionsstämme getestet, die eine chromosomal integrierte Kopie des T7 RNA-Polymerase Gens unter Kontrolle des *lac*-Promotors trugen. Des Weiteren wurden die Versuchsparameter mehrfach modifiziert (Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer, IPTG-Konzentration,  $\text{O}_2$ -Gehalt, Carbenicillin- und Glukose-Zugabe), um die optimalen Bedingungen zur Proteinexpression zu ermitteln.

##### 3.7.1 Klonierungsstrategie im Impact-CN-System

Im Impact-System (*Intein mediated purification with an affinity binding tag*) konnte das *flaB0*-Gen zwischen die *NdeI* und *SmaI*-Schnittstellen in der *multiple cloning site* (*mcs*) des Vektors PTYB2 gebracht werden. Das Zielgen wurde so am C-Terminus mit Intein-Tag fusioniert (Abb. 3-33).

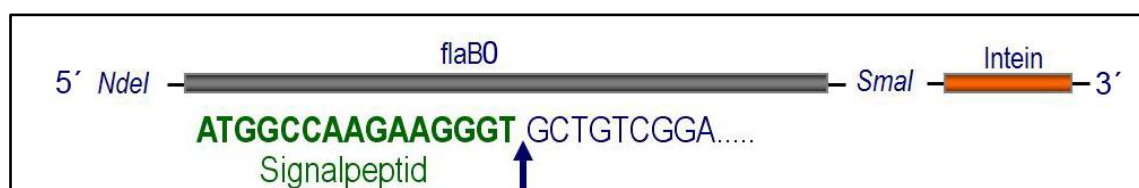
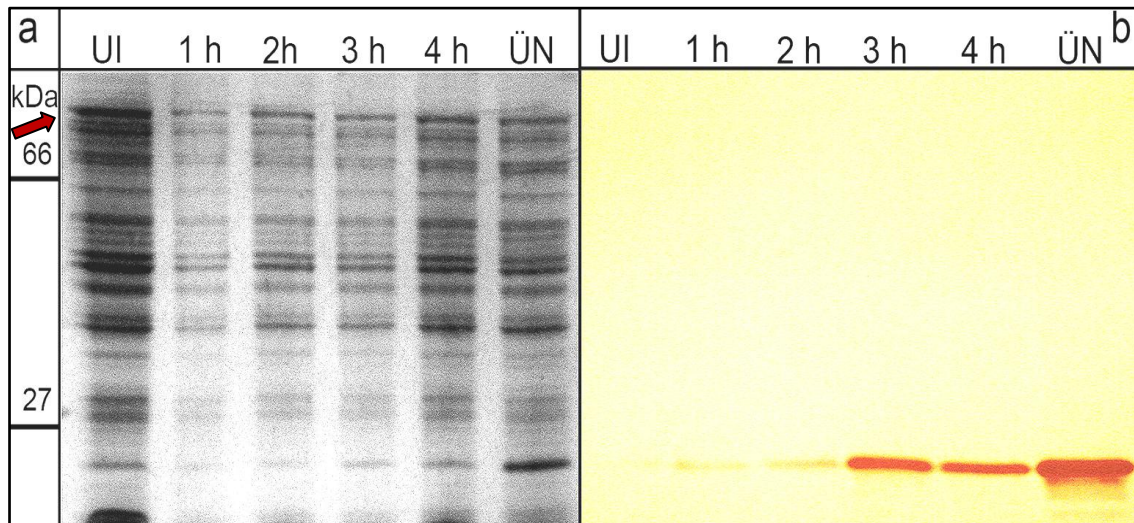


Abbildung 3-33: Darstellung der Orientierung von *flaB0* in der *mcs* des Expressionsvektors PTYB2.

Über die Wahl der Primer wurde eine Genvariante von *flaB0* ohne das Signalpeptid (Schnittstelle siehe Abb. 3-33, blauer Pfeil) erstellt und mit den Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *NdeI* und *SmaI* versehen. Das Gen wurde in PTYB2 kloniert und anschließend in elektrokompetente *E. coli* ER2566-Zellen transformiert. Hierbei wurde Ampicillin als Selektionsmarker für potentiell „positive“ Klone verwendet. Ein Klon, der das Insert mit einem konservierten Aminosäureaustausch trug, wurde auf die Expression des rekombinanten Proteins hin untersucht. Dazu wurden die *E. coli*-Zellen bei 15°, RT und 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert und mit 0,4 mM IPTG induziert. Die Entnahme der Proben erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten, wobei die Mediumfraktion, sowie die lösliche und unlösliche Fraktion auf den Gehalt an rekombinantem Protein hin analysiert wurden. Das Auftreten von Zelllyse wurde bereits 90 min nach der Induktion beobachtet und war am stärksten bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Nach einer üN-Inkubation waren die Zellen in allen drei Temperaturansätzen nahezu vollständig lysiert, was ein Hinweis auf eine gewisse Toxizität des rekombinanten Flagellins war. Die Analyse von Aliquots zeigte auf, dass es zu keiner signifikanten Expression von rekombinantem FlaB0 in der löslichen Fraktion, und nur zu geringem Ausmaß in der unlöslichen Fraktion gekommen war. In Abb. 3-34 sind Proben aus der unlöslichen Fraktion einer Kultur, die bei 15°C induziert worden war, dargestellt. Durch einen Westernblot mit dem primären Antikörper gegen die Gesamtflagellen konnten Banden detektiert werden, deren Stärke mit zunehmender Inkubationsdauer anstieg. Die Banden besaßen ein Molekulargewicht von 25 kDa, was in etwa dem von unglykosiliertem FlaB0 gleichkommt (siehe Tab. 3-4). Es wären jedoch prominente Banden auf der Höhe von ca. 80 kDa (Abb. 3-34, roter Pfeil) zu erwarten gewesen, die der Größe des Fusionsproteins aus FlaB0 und dem Intein-Tag entsprechen würden.

Nach genauer Analyse der Sequenz wurde klar, dass ein unerwünschtes Stoppcodon vorhanden war, so dass der Intein-Tag nicht exprimiert werden konnte. Aufgrund des fehlenden Tags konnte das erzeugte rekombinante FlaB0 nicht aufgereinigt werden. Dennoch wurde durch diese Versuche deutlich, dass rekombinantes FlaB0 mit einem Molekulargewicht ähnlich dem des nativen, unglykosilierten Proteins von *E. coli* produziert werden kann. Aus diesem Grund wurde für weitere Klonierungsexperimente das pET-System verwendet, in dem das Zielprotein zur späteren Aufreinigung mit einem kleinen His<sub>6</sub>-Tag (Molekulargewicht <1 kDa) fusioniert werden konnte.

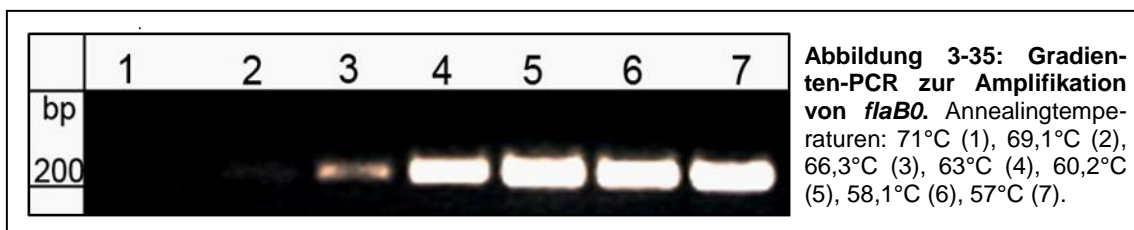


**Abbildung 3-34: Induktionsversuche von FlaB0 in *E. coli* ER2566 bei 15°C.** Darstellung der uninduzierten Kontrolle (UI), sowie der Proben aus der unlöslichen Fraktionen nach der Induktion. Die Entnahme der Aliquots erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, nach ÜN-Inkubation). a: coomassie-gefärbtes Gel (12,5 % AA). Der rote Pfeil deutet die Höhe des erwarteten Fusionsproteins aus FlaB0 und dem Intein-Tag an. b: korrespondierender Westernblot, bei dem Banden in einer Höhe von ca. 25 kDa detektiert werden konnten. 1°AK Anti-Fla Pfu 1/2000, 2°AK goat-anti rabbit IgG 1/2000.

### 3.7.2 Klonierungsstrategie im pET-System

Das pET-System galt als gut geeignet, um die basale Expression von Genen durch die T7 RNA-Polymerase gering zu halten. Dies ist gerade bei Genen, deren Genprodukte toxisch auf *E. coli*-Zellen wirken wichtig, da bereits eine minimale basale Expression zur Lyse der Zellen und zur Destabilisierung der Plasmide beitragen kann.

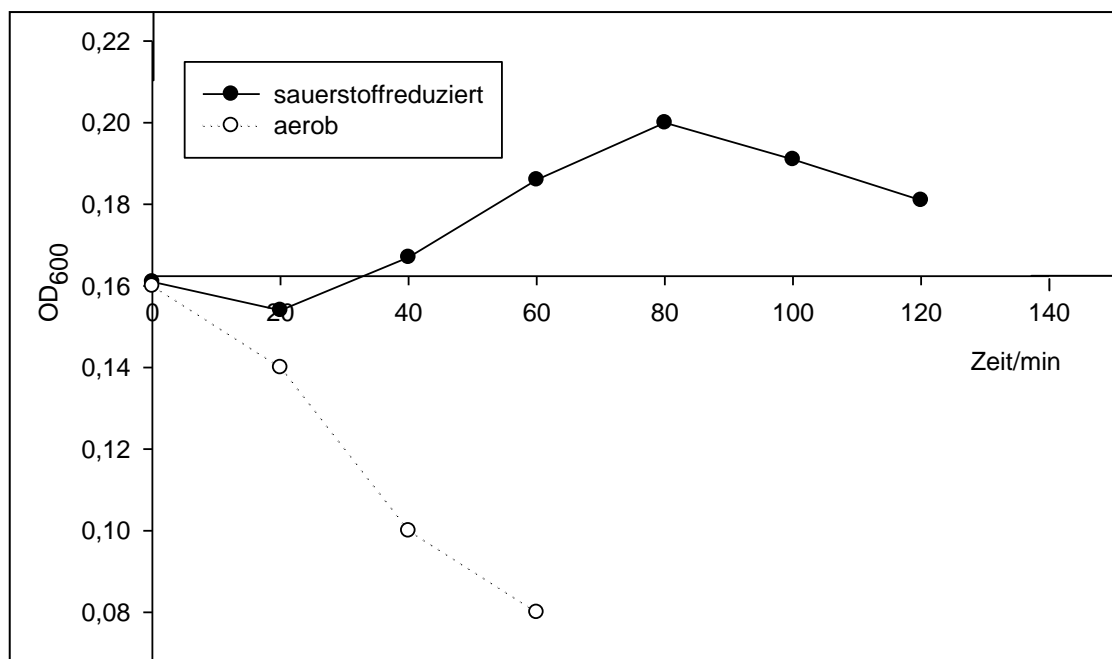
Die Bedingungen für die Amplifikation von *flaB0* wurden über eine Gradienten-PCR ermittelt, wobei sich eine Annealingtemperatur von 57°-63°C als optimal erwies (Abb. 3-35). Anschließend wurde das Gen zwischen die *Nde*I und *Bam*HI-Schnittstelle in der *mcs* des Vektors pET14b oder 15b kloniert und so mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag versehen.



**Abbildung 3-35: Gradienten-PCR zur Amplifikation von *flaB0*.** Annealingtemperaturen: 71°C (1), 69,1°C (2), 66,3°C (3), 63°C (4), 60,2°C (5), 58,1°C (6), 57°C (7).

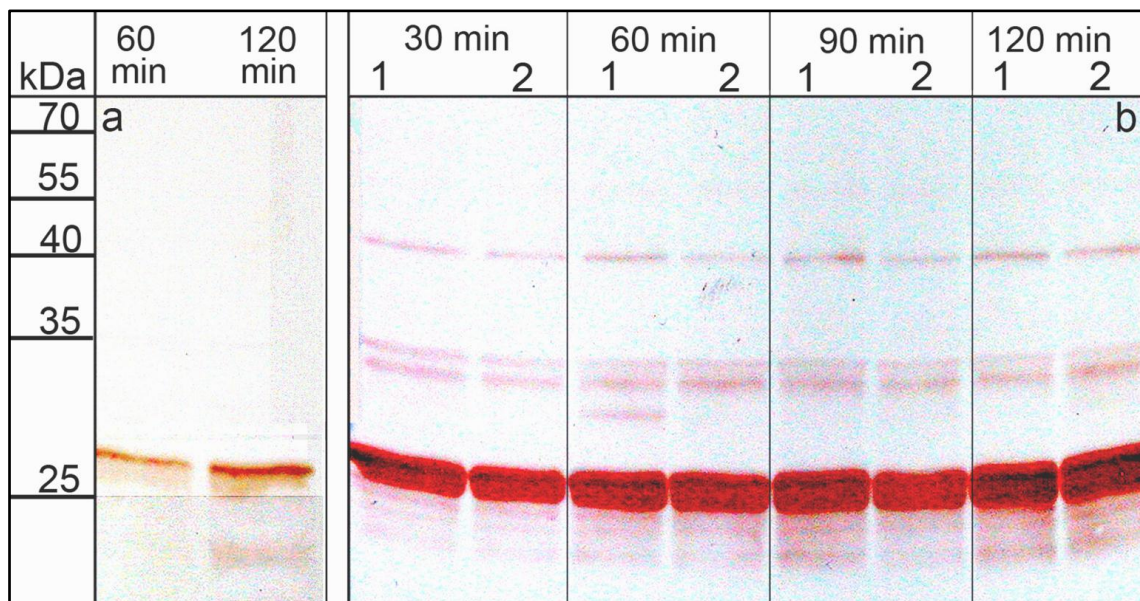


Das Konstrukt wurde über einen Heatshock in den *E. coli*-Klonierungsstamm DH5 $\alpha$  transformiert, ein Zwischenschritt, der die Stabilität der Plasmide in den Zellen erhöhen soll. Anschließend wurde das Plasmid in verschiedene Expressionsstämme (*E. coli* ER2566, Rosetta(DE3)pLysS, BL21Star(DE3), BL21(DE3)pLysS) umklontiert, um den für die Expression des vermeintlich toxischen Genprodukts am besten geeigneten zu evaluieren. In den ersten drei der genannten Stämme kam es weder bei Verwendung von pET14b noch 15b zu einer Expression des *flaB0*-Gens. Transformierte *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen produzierten das Flagellin in kleiner Menge, was über Westernblot nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wurde versucht, die Expression von FlaB0 in diesem Stamm zu optimieren. Hierzu wurden die Zellen in Anwesenheit einer hohen Konzentration an Carbenicillin (bis zu 500 mg/ml) kultiviert, welches im Vergleich zu Ampicillin eine höhere Beständigkeit gegen  $\beta$ -Lactamase aufweist. Des Weiteren wurde der Effekt einer Glukose-Zugabe (1 %, w/v) zum Medium getestet, welche zu einer signifikanten Herabsetzung der basalen Transkription und somit zur Stabilisierung der Plasmide beitragen kann. Die Inkubation der induzierten Zellen erfolgte sowohl bei 37°C als auch bei 30°C, da eine Temperaturniedrigung eine bessere Löslichkeit und Faltung rekombinanter Proteine in der Zelle bewirken kann. Neben der Induktion mit unterschiedlichen Mengen an IPTG (0,1 mM-1,0 mM) wurden die Zellen auch unter variierendem Sauerstoffgehalt kultiviert. Dazu wurde eine Kultur bei aeroben und sauerstoffreduzierte Bedingungen gezüchtet (Abb. 3-36).



**Abbildung 3-36: Darstellung des Wachstums von transformierten *E. coli*-Zellen nach der Induktion durch Messung der OD<sub>600</sub>.** Die Zellen wurden mit 1 mM IPTG zum Zeitpunkt 0 induziert und bei 37°C unter aeroben oder sauerstoffreduzierten Bedingungen inkubiert. Bei Zellen aus der sauerstoffreduzierten Kultivierung trat die Lyse verzögert ein.

Es zeigte sich, dass bei Zellen, die unter „normalen“ aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert worden waren, die Lyse bereits 20 min nach der Induktion mit 1 mM IPTG einsetzte, wohingegen die Zellyse unter sauerstoffreduzierten Bedingungen verzögert werden konnte. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots induzierter Zellen entnommen und auf die Produktion von rekombinantem FlaB0 hin untersucht. Dazu wurde das Gesamtzellprotein (*Total Cell Protein*, TCP) sowohl über SDS-PAGE, als auch über Westernblot analysiert. Das Flagellin war in beiden Ansätzen in so geringer Menge vorhanden, dass es lediglich über Westernblot nachgewiesen werden konnte. Hier konnte das rekombinante Protein sowohl mit dem polyklonalen Antikörper gegen die Gesamtflagellen (Anti-Fla Pfu), als auch mit dem monoklonalen Antikörper gegen den His-Tag (Anti-His<sub>6</sub>) detektiert werden. Im Westernblot in Abb. 3-37 wurden je 2 µg TCP von induzierten *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen aufgetragen. Die Zellen in Abb. 3-37 a wurden bei 37°C unter aeroben Bedingungen kultiviert. Anti-His<sub>6</sub>, der hier als primärer Antikörper eingesetzt worden war, markierte spezifisch nur den am rekombinanten Protein befindlichen His-Tag. In Abhängigkeit von der Zeit kam es jedoch nicht zur Steigerung der Proteinexpression. Dies war ebenso nicht der Fall bei Zellen, die bei 30°C unter sauerstoffreduzierten Bedingungen kultiviert worden waren (Abb. 3-37 b), wobei Ansatz 1 mit 0,1 mM IPTG, Ansatz 2 mit 0,5 mM IPTG induziert worden war. Zusammenfassend machten diese Ergebnisse deutlich, dass die Expression von FlaB0, auch unter Berücksichtigung verschiedener Empfehlungen für toxischer Gene, nur in sehr begrenzter Menge erzielt werden kann.

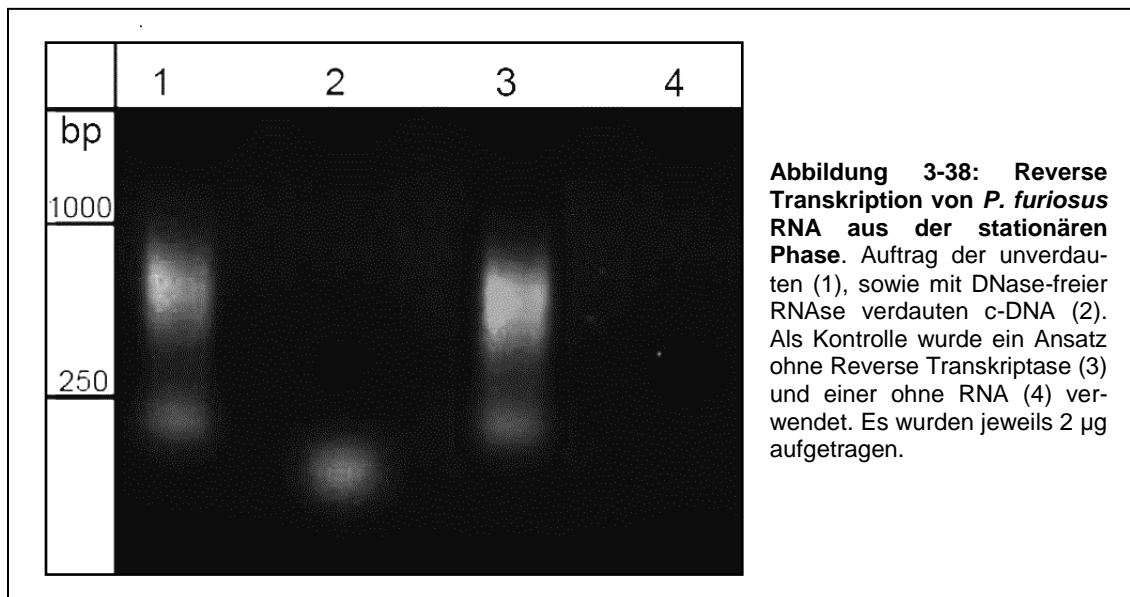


**Abbildung 3-37: Darstellung der Expression von FlaB0 in *E. coli* über Westernblot.** In (a) wurden die Zellen nach der Induktion mit 1 mM IPTG aerob bei 37°C kultiviert. In (b) wurden die Zellen mit 0,1 mM (1) oder 0,5 mM (2) IPTG induziert und unter sauerstoffreduzierten Bedingungen bei 30°C gezüchtet. Es wurden jeweils 2 µg Zellaufschluss aufgetragen. 1°AK anti-His<sub>6</sub> 1/2000 (a) bzw. anti-Fla Pfu (b) 1/5000, 2°AK rabbit anti-mouse IgG 1/2000 (a) bzw. goat anti-rabbit IgG 1/2000 (b).

### 3.8 Northern Blotting

RNA von *P. furiosus* wurde sowohl aus der exponentiellen, als auch der stationären Wachstumsphase isoliert und im Northern Blot auf eine Nylon-Membran übertragen. Zur Detektion von Genen des *fla*-Operons wurden RNA-Sonden über *in-vitro* Transkription generiert und mit DIG-Molekülen gelabelt. Die Hybridisierung der immobilisierten RNA mit einer Sonde konnte so über Chemilumineszenz visualisiert werden.

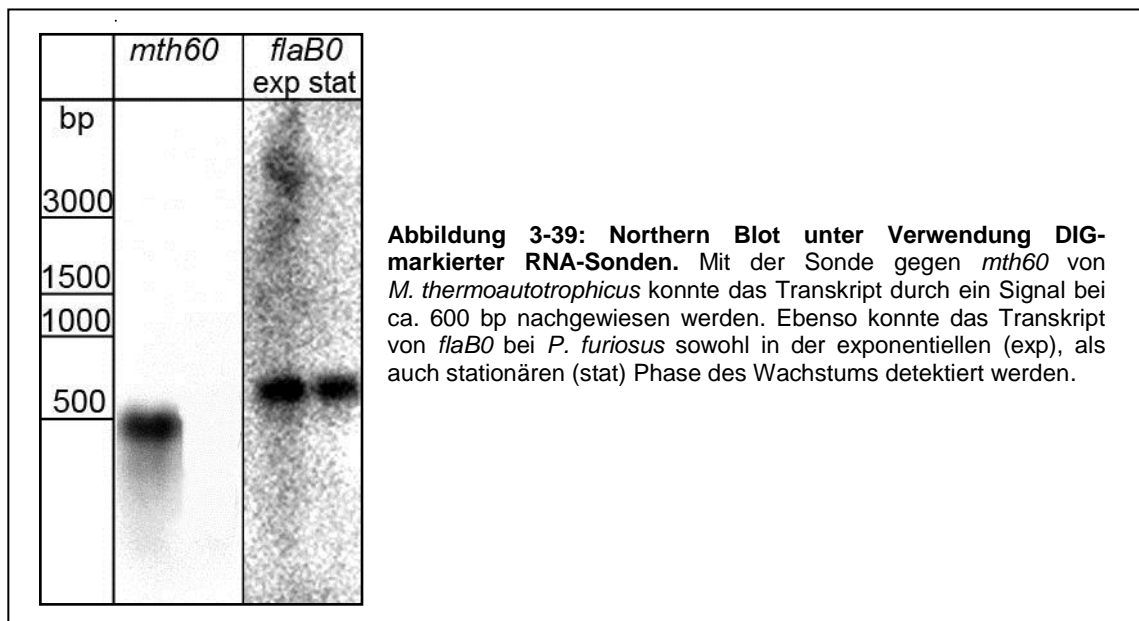
Der erste Schritt bei der Herstellung der Sonden bestand in der reversen Transkription der isolierten RNA. Dabei wurden Anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> Primer eingesetzt, die spezifisch für Poly(A)<sup>+</sup> RNA sind. Die umgeschriebene c-DNA, die zur Kontrolle auf einem 1 %igen Agarosegel (w/v) analysiert wurde, enthielt noch RNA-Kontaminationen (Abb. 3-38, Spur 1). Zur Entfernung dieser wurde die Probe teilweise mit DNase-freier RNase verdaut. Der sichtbare Schmier repräsentiert die umgeschriebene c-DNA (Abb. 3-38, Spur 2). In der Kontrolle, in der das Enzym Reverse Transkriptase nicht zugegeben wurde, konnte RNA, ähnlich zu Spur 1, als Schmier auf dem Gel detektiert werden (Abb. 3-38, Spur 3). Eine Kontrolle, die ohne Zugabe von RNA durchgeführt worden war, war negativ (Abb. 3-38, Spur 4).



Die c-DNA wurde als Template in eine PCR eingesetzt, in der *fla*-Gene mit spezifischen Primern amplifiziert wurden. Über die Rückwärtsprimer wurden die Gene mit der Sequenz für die T7 RNA-Polymerase versehen, durch welche die RNA-Sonden im nächsten Schritt *in-vitro* unter Einbau von DIG-Molekülen transkribiert wurden. Auf diese Art wurden RNA-Sonden für alle drei Flagelline (*flaB0*, *flaB1* und *flaB2*), sowie für alle bekannten akzessorischen Gene des *fla*-Operons (*flaC*, *flaD*, *flaF*, *flaG*, *flaH*, *flaI*, *flaJ*) hergestellt.

Zur Kontrolle, ob das System des Northern Blotting mit nicht-radioaktiver Detektion funktionierte, wurde ein bereits etabliertes System verwendet (Sarbu, 2009). Dazu wurde *M. thermoauto-*

*trophicus*-RNA aus der stationären Phase des Wachstums geblottet und mit einer Sonde gegen das Hauptfimbrien *mth60* hybridisiert. Wie aus Abb. 3-39 ersichtlich ist, konnte eine Bande auf der Höhe von 600 bp detektiert werden, wobei es sich um das Transkript von *mth60* handelte. Bei Verstärkung der Intensität wurde eine Bande bei ca. 1,3 kb sichtbar, die das Kotranskript von *mth60* mit *mth61* repräsentiert (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deckten sich mit bereits beschriebenen (Sarbu, 2009), so dass von einer korrekten Durchführung der Northern Blots ausgegangen werden konnte. Im nächsten Schritt wurde die RNA von *P. furiosus* aus der stationären und exponentiellen Wachstumsphase mit allen verfügbaren Sonden gegen die *fla*-Gene hybridisiert. Das einzig reproduzierbare Ergebnis konnte mit der Sonde gegen *flaB0* erzielt werden (Abb. 3-39). Hier trat eine Bande in der Höhe von ca. 600 bp auf, was dem Transkript von *flaB0*, welches aus 639 Nukleotiden besteht, entsprach. Bei der Stärke des detektierten Signals konnte kein Unterschied zwischen der stationären und der exponentiellen RNA festgestellt werden. Bei letzterer konnte zusätzlich ein Schmier bei ca. 6 kb detektiert werden, was vermutlich auf die Transkription von *flaB0* zusammen mit anderen Genen des Operons hinweist. Für alle weiteren getesteten Sonden konnte keine Hybridisierung nachgewiesen werden.



## 4 DISKUSSION

### 4.1 Cokultur aus *P. furiosus* und *M. kandleri*

#### 4.1.1 Flagellenvermittelte Interaktionen

Interaktionen zwischen Mikroorganismen spielen in der Natur eine wichtige Rolle, da die meisten Mikroorganismen in Oberflächen-assoziierten Gemeinschaften leben, die als Biofilme bezeichnet werden (Hall-Stoodley et al., 2004). Mittlerweile gelten die Mechanismen der Biofilmbildung gerade bei Bakterien als gut untersucht (Stoodley et al., 2001; 2002). Der derzeitige Wissensstand, was Interaktionen, Biofilmbildung und Zell-Zell-Kommunikation bei Archaeen betrifft, ist jedoch noch recht niedrig. Durch intensive Forschung an ausgewählten Vertretern, wie z.B. *M. thermoautotrophicus*, *P. furiosus* und *M. villosus* (Näther et al., 2006; Thoma et al., 2008; Bellack et al., 2010) konnte in den letzten Jahren im Labor der AG Prof. Wirth gezeigt werden, dass auch Archaeen zur Adhäsion an Oberflächen befähigt sind, was als erster Schritt bei der Ausbildung eines Biofilms gilt (Flemming und Wingender, 2001). Bei allen genannten Organismen spielten Zellanhänge (Fimbrien oder Flagellen) bei der Adhäsion an die Oberfläche eine Rolle. Kürzlich wurde auch für einen Vertreter der Crenarchaeota, *Sulfolobus solfataricus*, eine Adhäsion an verschiedenen Oberflächen gezeigt (Zolghadr et al., 2010). Dieser Organismus zeichnet sich durch das Auftreten von zwei verschiedenen Typen von Zellanhängen aus, Flagellen und Pili. Während erstere maßgeblich an der Kontaktaufnahme mit der Oberfläche beteiligt sind, werden die Pili zur konstanten Aufrechterhaltung der Adhäsion benötigt. Experimente mit Flagellen- und Pili-Mutanten von *S. solfataricus* PBL2025 zeigten, dass die Organismen ohne ihre Zellanhänge weitestgehend die Fähigkeit zur Oberflächenadhäsion verlieren (Zolghadr et al., 2010). Auch bei *P. furiosus* sind die Flagellen an der Adhäsion beteiligt, was über Ablöseversuche mit Anti-Flagellen Antikörpern demonstriert werden konnte (Näther et al., 2006). Im Gegensatz zu *S. solfataricus* werden diese Zellanhänge zur dauerhaften Adhäsion an die Oberfläche benötigt.

Die Frage, ob *P. furiosus* auch an biotische Oberflächen adhärieren kann, wurde mit der erfolgreichen Etablierung einer Cokultur zusammen mit dem hyperthermophilen, anaeroben und marinen Organismus *M. kandleri* aufgeklärt (Schopf et al., 2008). Aus der gemeinsamen Kultivierung von *P. furiosus* und *M. kandleri* resultierte auf Glas ein strukturierter archaeeller Bi-Spezies-Biofilm, bei dem die Flagellen auch für Interaktion zwischen den Archaeen wichtig waren. So standen die beiden Organismen durch die Flagellen, aber auch direkt, in einem engen Kontakt, was eine Voraussetzung für den optimalen Transfer von H<sub>2</sub> darstellen könnte. Kürzlich war die Etablierung von vier weiteren Cokulturen zwischen *P. furiosus* und Vertretern der *Methanocaldococcaceae* aufgrund eines interspezies-H<sub>2</sub>-Transfers gelungen. Dabei waren die



Interaktionen der Organismen in zwei der Cokulturen (*P. furiosus*/*M. villosus* und *P. furiosus*/*Methanocaldococcus infernus*) von positiver Natur, so dass die Partner von der gegenseitigen Kultivierung profitierten. In einer weiteren Cokultur zwischen *P. furiosus* und *Methanocaldococcus janaschii* waren die Interaktionen neutral, wohingegen zwischen *P. furiosus* und *Methanotorris igneus* negative Effekte auf das Wachstum des Methanogenen beobachtet werden konnten (Weiner, 2010). Das Adhäsionsverhalten der Organismen wurde in der Cokultur zwischen *P. furiosus* und *M. villosus* genauer untersucht. Hier zeigte sich, dass die Organismen lose Aggregate auf festen Oberflächen, aber auch im Flüssigmedium ausbildeten, in denen beide Organismen in zufälliger Verteilung vorlagen (im Gegensatz zum strukturierten Biofilm bei *P. furiosus*/*M. kandleri*). Auch in dieser Cokultur interagierten die Zellen intensiv über ihre Flagellen, welche auf Materialien wie Deckglas und Glimmer ein dichtes Netzwerk ausbildeten. Vor diesem Hintergrund wird klar, dass flagellenvermittelte Interaktionen bei *P. furiosus* keine Seltenheit sind, sondern vielmehr der Kontaktaufnahme zu arteigenen und artfremden Individuen dienen. Ob *P. furiosus* über seine Flagellen kommunizieren kann, ist momentan spekulativ. Es gibt aber einige Fälle in der Literatur, die auf eine Kommunikation von Mikroorganismen über ihre Zellanhänge hinweisen. So wurde für eine Cokultur zwischen dem Bakterium *Pelotomaculum thermopropionicum* und dem Archaeum *M. thermoautotrophicus* von einer Zell-Zell-Kommunikation über die Flagellen berichtet (Shimoyama et al., 2009). In dieser Cokultur wurden die Zellaggregate über die Flagellen des Bakteriums stabilisiert. Es zeigte sich, dass durch das Protein an der Spitze der Flagellen eine Genexpression bei dem Archaeum induziert wurde, die zur gesteigerten Expression der Gene für die Methanogenese führten. Auch bei hochentwickelten phototrophen Konsortien, die weltweit in stratifizierenden Seen zu finden sind und dort bis zu zwei Drittel der gesamten Biomasse ausmachen, könnten Zellanhänge eine mögliche Rolle bei der Zellkommunikation und Adhäsion spielen (Glaeser und Overmann, 2004; Wanner et al., 2008). Die Konsortien bestehen typischerweise aus zwei verschiedenen Arten von Prokaryonten, die einen permanenten Zell-Zell-Kontakt aufrecht erhalten. Denkbar wäre auch, dass Zell-Zell-Kommunikation über sogenannte Quorum-Sensing Signale stattfindet. Bislang sind bei Archaeen, mit Ausnahme von *Natronococcus occultus* (Paggi et al., 2003), jedoch keine Signale vergleichbar mit Homoserinlaktonen, bekannt. Dass diese in einer Kultur aus hyperthermophilen Mikroorganismen auftreten, erscheint aufgrund ihrer Hitzelabilität jedoch unwahrscheinlich. In einer Studie, in der mehr als 800 archaeelle Isolate auf die Produktion von Quorum-Sensing Signalen getestet wurden, konnte kein einziges detektiert werden. Sowohl im Kulturüberstand, als auch auf DNA-Ebene konnten keine Hinweise auf die Existenz solcher Signalmoleküle gefunden werden (Wirth, unpubliziert). Aus diesem Grund ist derzeit unklar, wie *P. furiosus* in den etablierten Cokulturen mit den Methanogenen kommunizieren kann.

### 4.1.2 Entwicklung des Bi-Spezies-Biofilms

Bei der Etablierung der Cokultur *P. furiosus*/*M. kandleri* wurden diese beiden Archaeen ausgewählt, da sie morphologisch gut voneinander differenzierbar sind (Kokke vs. Stäbchen) und zudem beide in marinen Hochtemperaturhabitaten vorkommen. Auf festen Oberflächen wuchs die Cokultur zum Biofilm unter Ausbildung der sogenannten Spiegelei-Kolonien heran, wobei es sich um den ersten bekannten strukturierten archaeellen Bi-Spezies-Biofilm handelte (Schopf et al., 2008). Dass selbst nah verwandte Mikroorganismen Biofilme mit unterschiedlicher Architektur ausbilden können, wurde in einer kürzlich durchgeführten Studie an *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* und *S. tokodaii* gezeigt (Koerdts et al., 2010). Alle drei Stämme bildeten innerhalb von 3 Tagen Biofilme mit jedoch deutlich voneinander abweichender Struktur aus: Im Biofilm von *S. solfataricus* waren die Zellen mit geringer Zelldichte über die ganze Oberfläche verteilt. *S. tokodaii*-Biofilme zeichneten sich ebenfalls durch ein flächenhaftes Wachstum aus, wobei die Zelldichte hier hoch war und gelegentlich Aggregate auftraten. *S. acidocaldarius* hingegen bildete Biofilme aus, in denen die Zellen dicht gepackt und in großen Aggregaten „turmartig“ vorlagen. Die Entwicklung des zuletzt genannten Biofilms konnte über einen Zeitraum von 7 Tagen hinweg beobachtet werden. Kurz nach dem Start des Experimentes konnten bereits einige wenige adhärierende Zellen auf der Oberfläche (hier ein mit Polylysin beschichtetes Deckglas) beobachtet werden. Weitere zwei Stunden später war die Zellzahl auf der Oberfläche zwar nicht erhöht, jedoch hatten fast alle Zellen filamentöse Strukturen zur Adhäsion an die Oberfläche oder an Nachbarzellen ausgebildet. Nach 36 h begann die Ausbildung von Mikrokolonien, wobei auf dem restlichen Deckglas weiter nur vereinzelt Zellen vorlagen. Eine Inkubation über 48 h führte zu einer kompletten Besiedlung der Deckglasoberfläche mit Zellen. Im Vergleich dazu ging die Ausbildung des *P. furiosus*/*M. kandleri*-Biofilms sehr rasch von statten. In einem Zeitfenster von ca. 15 h entwickelten sich die Spiegelei-Kolonien mit den *M. kandleri*-Zellen an der Basis und darauf wachsenden *P. furiosus*-Zellen. Einer Phase der Verankerung der Zellen (hier der *M. kandleri*-Zellen) auf der Oberfläche folgte eine weitere, in der es zur Akkumulation kam. Diese wird vor allem durch die Vermehrung der Organismen bestimmt, aber auch von neu hinzukommenden Zellen aus der Schwimmphase begleitet (Flemming und Wingender, 2001). So wurde für *E. coli* durch verschiedene Mutationen der *fla*- und *che*-Gene, die für Flagellation bzw. Chemotaxis verantwortlich sind, gezeigt, dass die Motilität unentbehrlich ist zur Ausbildung eines normalen Biofilms (Pratt und Kolter, 1998). Auch in der Cokultur *P. furiosus*/*M. kandleri* ist anzunehmen, dass die Besiedlung der *M. kandleri*-Zellen ein aktiver Prozess ist, der durch eine gerichtete Schwimmbewegung von *P. furiosus* zustande kommt. Da sich der Biofilm sich sehr rasch entwickelt, ist es unwahrscheinlich, dass die vorhandene Vielzahl an *P. furiosus*-Zellen (selbst bei Berücksichtigung einer optimalen Verdoppelungszeit von 37 min) alleine durch Zellteilung zustande kommt.

### 4.1.3 Antikörper gegen Oberflächenstrukturen

Zur Analyse der Biofilmstruktur wurde vor allem auf Fluoreszenzmikroskopie zurückgegriffen. Für die Unterscheidung von *P. furiosus* und *M. kandleri* im Biofilm wurden Antikörper gegen (nicht spezifizierte) Zelloberflächenkomponenten von gescherten *P. furiosus*-Zellen bzw. oberflächenassoziierte Proteine von *M. kandleri* generiert. Beim Einsatz der Antikörper zeigte sich, dass diese die Ablösung der Zellen von der Oberfläche bewirkten. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Zellanhänge von *P. furiosus* und *M. kandleri* bei der Scherprozedur nicht ganz von den Zellen entfernt werden konnten und als Antigene eine Immunreaktion im Kaninchen hervorriefen. Dass *M. kandleri*, wie ursprünglich beschrieben (Kurr et al., 1991), Flagellen besitzt, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Dies ist im Hinblick auf die Tatsache, dass dem Organismus sämtliche *fla*-Gene fehlen, jedoch nicht verwunderlich (Ng et al., 2008). Allerdings war die Darstellung dünner Zellanhänge gelungen, bei denen es sich aufgrund des geringen Durchmessers von ca. 5 nm um Fimbrien handeln könnte (Schopf, 2006).

Da der Mechanismus der Adhäsion an Oberflächen bei *P. furiosus* nicht geklärt ist, bestünde auch die Möglichkeit, dass weitere oberflächenassoziierte Strukturen mit antigenen Eigenschaften an der Adhäsion beteiligt sind. Adhäsine an den Flagellen, wie z.B. FimH oder PapGII an der Spitze der Fimbrien uropathogener *E. coli*s (de Greve et al., 2007), kommen bei *P. furiosus* nicht vor. Denkbar wäre, dass der S-Layer und/oder Glykane bei der Anheftung an Oberflächen beteiligt ist. Bisher konnte ein S-Layer als Zellwand von *P. furiosus* nicht eindeutig identifiziert werden (Zach, 2009), auch wenn seine Darstellung über Elektronenmikroskopie gelungen war (Schuster, 2003; Schopf, 2006). Glykoproteine in Form von S-Layern und Flagellen sind bei Archaeen weit verbreiten (Schäffer und Messner, 2001; Logan, 2006; Ng et al., 2006). Im Fall von *M. voltae* konnte sogar gezeigt werden, dass die Flagellen und der S-Layer dasselbe Glykosilierungsmuster durch ein N-glykosidisches Trisaccharid aufweisen (Voisin et al., 2005). Dass auch die Flagellen von *P. furiosus* aus Glykoproteinen aufgebaut sind, konnte indirekt über PAS-Färbung nachgewiesen werden (Näther et al., 2006). Sollten also Glykane an der Oberflächenadhäsion von *P. furiosus* mitwirken, so ist auch eine Ablösung durch gegen sie gerichtete Antikörper denkbar.

Des Weiteren gelang durch den Einsatz eines sekundären Antikörpers die Darstellung von Flagellen bei festgehefteten *P. furiosus*-Zellen, die in der Cokultur mit *M. kandleri* gezüchtet worden waren. Dieser Befund war besonders interessant, da die Flagellen von *P. furiosus* durch direkte Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen nicht visualisierbar waren, so wie es z.B. für *E. coli* der Fall war (Wirth et al., 2011). Vermutlich sind die für eine Farbstoffkopplung benötigten primären Aminogruppen (z.B. an Lysin) unzugänglich.

### 4.2 Mikrobielle Adhäsion

#### 4.2.1 Mikrobielle Adhäsion als multifaktorisches Ereignis

Gerade in der medizinischen Forschung und Krankenhaushygiene sind die Bemühungen groß, die Mechanismen der Oberflächenadhäsion und Biofilmbildung genau zu verstehen (z.B. Estaban et al., 2010; Nayak et al., 2011). Die Faktoren, welche die Adhäsion von Mikroorganismen an eine Oberfläche beeinflussen, sind vielfältig. Im Bezug auf die Oberfläche spielen ihre chemische Zusammensetzung (Speranza et al., 2004), die Ladung (Gottenbos et al., 2000), Hydrophobizität (Triandafillu et al., 2003) und Rauheit (Scheuerman et al., 1998) eine wichtige Rolle. Doch auch die Eigenschaften der Mikroorganismen müssen mit einbezogen werden, da eine Oberfläche von verschiedenen bakteriellen Spezies unterschiedlich bewachsen werden kann (Katsikogianni und Missirlis, 2004). Bakterien, die selbst eine hydrophobe Oberfläche besitzen, besiedeln z.B. bevorzugt auch hydrophobe Materialien. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Ladung der mikrobiellen Zelloberfläche. Diese ist meistens negativ, aber von verschiedenen Faktoren wie z.B. dem pH, der Ionenstärke des Mediums, oder dem Alter der Bakterienkultur abhängig. Nicht zu vergessen sind extrazelluläre Strukturen der Mikroorganismen, wie Pili und Fimbrien oder extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), die zur Besiedlung von Oberflächen benötigt werden (Flemming und Wingender, 2010; Lehti et al., 2010; Okahashi et al., 2011). Bei der Anheftung von Mikroorganismen handelt es sich also um ein komplexes Ereignis, das unter Beteiligung mehrerer Faktoren stattfindet. Die der Adhäsion zugrundeliegenden Mechanismen sind bei den Archaeen, verglichen mit Bakterien, weitaus weniger verstanden.

#### 4.2.2 Die Rolle der Oberfläche für die Biofilmarchitektur

In der Cokultur *P. furiosus*/*M. kandleri* konnten auf den Oberflächen Glas und Glaskohle zwei verschiedene Biofilmarchitekturen beobachtet werden. Auf Glas, hier Borsilikatglas, bildeten die Zellen die dreidimensional strukturierten Spiegelei-Kolonien aus. Glasmaterialien konnten zum Zeitpunkt der Etablierung dieser Cokultur von *M. kandleri* gut, von *P. furiosus* nicht bewachsen werden (Schopf, 2006). In den Spiegelei-Kolonien befand sich *M. kandleri* an der Basis und bildeten die Grundlage für die weitere Anheftung von *P. furiosus*. Dieses als Coadhäsion bezeichnete Phänomen ist keine Seltenheit und konnte bereits bei vielen Mikroorganismen beobachtet werden: Es zeigte sich z.B., dass der Erreger der Listeriose, *Listeria monocytogenes*, Glasoberflächen nur sehr spärlich in Reinkultur besiedeln kann. In Cokultur mit *Pseudomonas fragi*, welcher die Oberfläche als Primärbesiedler bewächst, ist eine signifikante Steigerung der Adhäsion zu verzeichnen (Sasahara und Zottola, 1993). Auch bei der Bildung bakterieller Zahnbeläge, die unter Beteiligung von mehr als 500 verschiedenen Spezies stattfindet, spielt Coadhäsion eine wichtige Rolle (Kolenbrander, 2000). Alle Bakterien, die sich direkt an Zähne anheften können, interagieren mit dem Niederschlag aus Speichereiweiß und Epithelabschilfe-

rungen, dem sogenannten *Pellicle*, das bereits kurz nach dem Zähneputzen gebildet wird. Auf dieser Schicht siedeln fast ausnahmslos Vertreter der Gattung *Streptococcus* an, die der normalen Mundflora angehören. Durch diese Schicht aus Primärbesiedlern wird die Anheftung diverser Bakterien, wie beispielsweise *Porphyromonas gingivalis*, ermöglicht (Kolenbrander, 2000).

Auf dem Material Glaskohle, welches aus reinem Kohlenstoff mit fullerenartiger Mikrostruktur besteht, adhärten *P. furiosus* und *M. kandleri* nicht in geordneten dreidimensionalen Aggregaten, sondern dispers verteilt über die gesamte Oberfläche. Glaskohle konnte sowohl von *M. kandleri*, als auch von *P. furiosus* bewachsen werden, womit letzterer nicht auf die Coadhäsion an den Primärbesiedler angewiesen war.

Auffällig in diesem Zusammenhang ist, das Glas eine hydrophile, Glaskohle hingegen eine hydrophobe Oberfläche darstellt. Bei Plexiglas (Polymethylmethacrylat), das als Referenzoberfläche für sehr guten Bewuchs durch *P. furiosus* verwendet wurde, handelt es sich ebenfalls um eine hydrophobe Oberfläche. Dies spricht für ein bevorzugtes Wachstum von *P. furiosus* auf hydrophoben Oberflächen. Dass die chemischen Eigenschaften des Materials bei der Anheftung von Archaeen wichtig sind, konnte auch im Fall von drei Vertretern der Gattung *Sulfolobus* gezeigt werden, welche vorrangig an hydrophile Oberflächen adhärten (Koerdt et al, 2010). *S. solfataricus* bildet EPS auf den Materialien Glimmer und Glas (beide hydrophil), nicht aber auf kohlebefilmten Grids (hydrophob) aus (Zolghadr et al., 2010). Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass durch die EPS eine hydrophobe Umgebung für ebenfalls hydrophobe Zellanänge bzw. Oberflächenstrukturen geschaffen wird. In der Cokultur *P. furiosus*/*M. kandleri* konnte die Bildung von EPS indirekt über eine positive Calcofluor-Färbung nachgewiesen werden (Schopf, 2006), die auf das Vorhandensein von  $\beta$ -glykosidischen Polysacchariden hindeutet (Johnson et al., 2005). *M. kandleri* fluoreszierte in der Schwimmphase deutlich, während bei *P. furiosus* nur ein äußerst schwaches Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. Nach Kontakt mit einer Oberfläche ließen sich beide Organismen gut mit Calcofluor anfärben, was als Indiz für eine verstärkte Bildung von EPS gewertet wurde. Allerdings konnte kein Unterschied in der EPS-Bildung auf hydrophoben und hydrophilen Oberflächen beobachtet werden (Schopf, 2006), wie dies für *S. solfataricus* beschrieben worden war (Zolghadr et al., 2010).



##### 4.2.3 Veränderung des Adhäsionsverhaltens von *P. furiosus*

Das Adhäsionsverhalten einer laufenden Laborkultur von *P. furiosus* (*Laborstamm*) wurde mit dem in der Bakterienbank Regensburg hinterlegten „Typstamm“ Vc 1 (*Typstamm*) verglichen. Bei den analysierten Oberflächen wurde ein Augenmerk auf Glasmaterialien aus Borsilikat gelegt. Die Fähigkeit zur Anheftung an Glas hatte sich bei *P. furiosus* im Laufe einer Zeitspanne von zwei bis drei Jahren entwickelt. Zuvor konnte für den Organismus keine Adhäsion an dieses Material festgestellt werden (Näther, 2006). Die gewonnenen Daten zeigten, dass sich der *Laborstamm* im Gegensatz zum *Typstamm* an alle Glasoberflächen anheftet. Im Vergleich zu den im Jahre 2006 ermittelten Resultaten adhärierte der *Laborstamm* auch besser an alle weiteren getesteten Materialien. Somit hatte beim *Laborstamm* *P. furiosus* im Laufe der Zeit eine Selektion zum Wachstum auf Oberflächen hin stattgefunden. Auch in Cokultur mit *M. kandleri* verlief die Adhäsion der Zellen anders, als ursprünglich beschrieben. Im Unterschied zu der im Jahre 2006 (Schopf, 2006; Schopf et al., 2008) etablierten Cokultur bildeten der *Laborstamm* und *M. kandleri* in der Flüssigphase des Mediums mit bloßem Auge sichtbare Flocken (Weiner, 2010). Auf festen Oberflächen wuchs diese Cokultur weniger in Spiegelei-Kolonien, sondern vielmehr als flacher, mikrobieller Rasen über die gesamte Oberfläche. In Einklang mit früheren Ergebnissen stand hingegen, dass auch bei der aktuellen Cokultur die Bildung von EPS nachgewiesen werden konnte.

Ein Grund für die Veränderung von Reinkulturen im Labor ist sicherlich, dass die Organismen einer unnatürlichen Umgebung ausgesetzt sind. Zusätzlich fällt der Selektionsdruck durch die fehlende Konkurrenz anderer Mikroorganismen weg (Zavarzin, 2006). Nachvollziehbar ist in diesem Zusammenhang, dass die Expression nicht mehr benötigter Genprodukte, beispielsweise von Virulenzfaktoren, herunter reguliert wird. Letztendlich bedeutet diese Regulation für die Zellen in Reinkultur eine deutliche Einsparung an Energie. Kürzlich wurde von einer Labormutante von *Acidithiobacillus ferrooxidans* berichtet, welche die Fähigkeit verloren hatte, einen S-Layer an ihrer Zelloberfläche auszubilden (Klingl, 2011). Während der Wildtypstamm *A. ferrooxidans* SP5/1 einen streifenförmigen S-Layer mit p2-Symmetrie an der Oberfläche aufwies, hatte der Laborstamm  $\Delta$ Slp90 eine relativ glatte Zelloberfläche, die vermutlich durch die äußere Membran gebildet wurde. Außerdem traten in Kulturen des Laborstammes  $\Delta$ Slp90 deutlich mehr Kurzstäbchen bzw. annähernd kokkoide Zellen, verglichen mit SP5/1, auf. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass dem S-Layer durchaus eine Zellform-erhaltende Funktion zugeschrieben werden darf (Klingl, 2011). Auch bei *P. furiosus* wirkte sich die permanente Kultivierung in reichem Medium auf die Zellen aus, welche einerseits verstärkt an Oberflächen adhärierten, und andererseits eine zum Teil auffällig unregelmäßige Morphologie aufwiesen. Über die Hintergründe dieser ungewöhnlichen Zellform kann nur spekuliert werden. An einer funktionierenden Zellteilung besteht kein Zweifel, da die *Laborstamm*-Zellen in allen durchgeführten

Experimenten genauso gut wuchsen wie die *Typstamm*-Zellen. Außerdem konnte die vorhandene Teilungsregion im Mikroskop gezeigt und damit die Teilung visualisiert werden. Erst kürzlich konnte anhand von fluoreszierenden Farbstoffen gezeigt werden, dass der Einbau neuen Zellwandmaterials beim *Typstamm* *P. furiosus*, ähnlich wie bei bakteriellen Kokken, in der Septumregion stattfindet (Wirth et al., 2011). Ob dies beim *Laborstamm* ebenso der Fall ist, oder ob hier die Inkorporation der Wandbestandteile fehlgeleitet ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

### 4.3 Flagellen von *P. furiosus*

#### 4.3.1 Untersuchungen an Flagellen

Die besten Ergebnisse bei der Flagellenpräparation wurden durch Solubilisierung mit dem nicht-ionischen Detergenz DDM erzielt, was ursprünglich bei der Aufreinigung von ATPase-Komplexen eingesetzt worden war (Küper, 2010). Verglichen mit früheren Präparationen (Näther, 2007) wurden die Flagellen strukturschonend aus der Zellwand herausgelöst. So konnten intakte Zellanhänge mit basal assoziierten Strukturen isoliert werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zellanhänge aus drei glykosilierten Flagellinen (FlaB0, FlaB1 und FlaB2) bestehen, die sich in einem ca. 13 nm dicken Filament anordnen. Für das Filament wurde eine rechtsgängige Helix mit einer Ganghöhe von 4,4 nm bestimmt (Näther, 2007). Die Lokalisation der einzelnen Flagelline im Filament konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Da sich zu dem Zeitpunkt, an dem die hier vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, das genetische System von *P. furiosus* noch in der Etablierungsphase befand, wurde zur Klärung dieser Frage auf immunologische Methoden zurückgegriffen. Aufgrund des konservierten N-terminalen Abschnittes von FlaB0, FlaB1 und FlaB2 waren in vorangehenden Arbeiten Antikörper erzeugt worden, die gegen die variablen mittleren bzw. C-terminalen Bereiche gerichtet waren (Näther, 2007; Wimmer, 2007). Trotz dieser Maßnahme konnten Kreuzreaktionen der Antikörper nicht verhindert werden, wobei unspezifische Bindungen sicherlich auch dadurch gefördert wurden, dass die Antikörper aufgrund ihres niedrigen Titers in hoher Konzentration eingesetzt werden mussten.

Im TEM wurde die Bindung der Antikörper anhand von Immunlokalisationsexperimenten untersucht. In einigen Fällen konnte eine Bindung visualisiert werden, die Lokalisation der einzelnen Flagelline im Filament war mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Für FlaB0, das als eines der Hauptflagelline von *P. furiosus* postuliert worden war (Zach, 2009), konnte in keinem Experiment eine Bindung gezeigt werden. Anders verlief dagegen eine Studie zur Lokalisation der Flagelline FlaB3 und FlaA bei *M. voltae* (Bardy et al., 2002). Auch für diesen Organismus waren Antikörper gegen rekombinant erzeugte Flagellinteilbereiche generiert worden. Isolierte Flagellen von *M. voltae* wiesen eine gekrümmte Region an dem zur Zelle verlaufenden Ende auf, die mit dem Haken bakterieller Geißeln verglichen wurde.

Immunmarkierungsexperimente mit Anti-FlaB3 Antikörper im TEM wiesen auf eine Lokalisation von FlaB3 in der gekrümmten Region hin, so dass für dieses Protein eine Rolle als Hakenprotein vorgeschlagen wurde. Für FlaA wurde aufgrund von Immunoblots mit Anti-FlaA Antikörpern die Rolle des *minor* Flagellins postuliert. Die Immunlokalisationsexperimente ergaben in diesem Fall, dass das Flagellin im gesamten Filament verteilt vorliegt.

##### 4.3.2 Analyse flagellenassoziierter Strukturen

Bei der Präparation der Flagellen wurden häufig ringförmigen Proteine beobachtet, die frei oder in Assoziation mit dem Filament vorkommen konnten. Der Aufbau der Proteine ließ an Thermosomen denken, bei denen es sich um Chaperonine handelt, die eine ATP-abhängige Faltung von Polypeptidketten bewirken. Chaperonine sind sowohl bei Archaeen, Bakterien und Eukaryonten vorhanden und werden in zwei Untergruppen unterteilt (Kim et al., 1994): Zu den Gruppe I Chaperoninen gehören die GroEL/ES Heat-shock Proteine (Hsp) von Bakterien. Gruppe II Chaperonine hingegen kommen nur im Cytosol von Eukaryonten und Archaeen vor (Woese et al., 1990). Archaeelle Thermosomen sind Heat-shock Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa, die auch unter dem Namen Hsp60 bekannt sind (Lund, 2011). Der für Thermosomen bestimmte Durchmesser liegt jedoch, um einige ausgewählte Beispiele zu nennen, bei 14,5 nm für *M. kandleri* (Andrä et al., 1996) und 16 nm für *Sulfolobus solfataricus* (Knapp et al., 1994), *Thermoplasma acidophilum* (Ditzel et al., 1998) und *Thermococcus profundus* (Kim et al., 2002). Dementsprechend ist der Durchmesser der genannten archaeellen Thermosomen ca. halb so groß, wie der der hier gefundenen ringförmigen Proteinkomplexe (30 nm).

Die erste verfügbare Struktur eines archaeellen Thermosoms stammte aus *Thermoplasma acidophilum* und zeigte ein Protein mit achtsätzlicher Symmetrie. Dieses Thermosom besteht aus zwei gestapelten Ringen, die aus je vier alternierenden  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut sind (Ditzel et al., 1998). In *Sulfolobus shibatae* machen Chaperonine 4 % des Gesamtzellproteins aus. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass aufgereinigte Chaperonine ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml unter physiologischen Bedingungen Filamente ausbilden (Trent et al., 1997). Dieses Resultat deckte sich mit der Beobachtung von Filamenten innerhalb der *S. shibatae*-Zellen, die von der Größe und dem Erscheinungsbild an die eben beschriebenen Chaperonin-Filamente erinnerten. Immunlokalisationsexperimente im TEM zeigten außerdem eine Assoziation der Chaperonine mit zellulären Strukturen auf, was zu der Hypothese führte, dass die Filamente auch *in vivo* existieren könnten. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass archaeelle Chaperonin-Filamente cytoplasmatische Gerüststrukturen darstellen, die funktionell ähnlich sind zum Cytoskelett der Eukaryonten. Mehrfach wurde für Archaeen die Existenz eines „flexiblen“ Cytoskeletts vorgeschlagen, das es den Organismen ermöglichen soll, ihre Zellform

den äußeren Gegebenheiten, z.B. bei der Adhäsion an eine Oberfläche, anzupassen (Searcy und Hixon, 1991; Hixon und Searcy, 1993).

Auch die beschriebenen ringförmigen Proteine von *P. furiosus* waren zahlreich in jeder Flagellenfraktion vertreten. Dabei kamen sie zu einem geringen Teil flagellenassoziiert, jedoch mehrheitlich frei vor. Häufig konnten Aggregate und Ketten aus vielen ringförmigen Proteinen, beobachtet werden. Fraglich bleibt, wieso die ringförmigen Proteine mit den Flagellen in Verbindung stehen und ob sie eine Funktion als Cytoskelett erfüllen, wie es für *S. shibatae* beschrieben worden war (Trent et al., 1997). Außerdem zu klären bleibt, ob die über Westernblot mehrfach detektierte 60-kDa Bande tatsächlich das Dimer eines Flagellins darstellt, oder ob es sich dabei um die vermeintlichen Thermosomen handeln könnte. Ein nächster Schritt zur Identifikation dieser Proteine würde in der Generierung von Antikörpern gegen Hsp60 bestehen, die anschließend in Immunlokalisationsexperimenten eingesetzt werden könnten.

Bei Flagellenpräparationen von *P. furiosus* traten besonders in einer Fraktion streifenförmige Proteinkomplexe auf, die als *Tubes* bezeichnet wurden. Es besteht ein hinreichender Verdacht, dass es sich bei den *Tubes* um hohle Strukturen handelt, die mit weiteren Proteinen gefüllt sind. Diese erinnerten vom Erscheinungsbild her an die oben genannten ringförmigen Proteine. Die Verbindung zwischen *Tubes*, ringförmigen Proteinen und Flagellen konnte zwar nicht dargestellt werden, es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass die drei Strukturen miteinander assoziiert sind. Denkbar wäre, dass die *Tubes* eine stabilisierende Funktion am Zellpol ausüben, an dem die Flagellen aus der Zelle austreten. In Ultradünnschnitten konnte eindeutig eine elektronendichte Linie dargestellt werden, die unterhalb der Cytoplasmamembran am Zellpol lokalisiert ist. Ob es sich hierbei um *Tubes* handelt oder um eine *discoïd lamellar structure*, wie bei *H. salinarum* postuliert (Metlina, 2004), ist spekulativ. Zur Aufklärung dieser Beobachtungen sind weiterführende Untersuchungen nötig. Auch Chemorezeptoren stehen im Verdacht, am Zellpol von *P. furiosus* lokalisiert zu sein. In *E. coli* liegen die Chemorezeptoren in quasi-kristalliner Anordnung an der Polregion vor (Weis et al., 2003). Die in dieser Arbeit erhaltenen TEM-Daten könnten dies auch für *P. furiosus* vermuten lassen. Eine entsprechende Beobachtung wurde an Ultradünnschnitten von *M. villosus* gemacht (Bellack, unpubliziert). Da das Genom von *M. villosus* nicht verfügbar ist, kann im Moment keine Aussage über das Vorhandensein von *che*-Genen in diesem Organismus getroffen werden. Überraschend in diesem Zusammenhang war, dass im Genom von *P. furiosus* keine Gene mit Ähnlichkeiten zu bakteriellen und archaeellen *che*-Genen gefunden werden konnten, wie sie bei den verwandten Spezies *P. abyssi*, *P. horikoshii* und *Thermococcus kodakaraensis* (Maeder et al., 1999; Szurmant und Ordal 2004; Schlesner et al., 2009) vorliegen. Es besteht die Möglichkeit einer fehlerhaften Sequenzierung oder Annotation, wie es auch bei den Flagellinen der Fall war (Näther, 2007).

Chemotaxis bei Archaeen ist vor allem bei Halophilen untersucht worden. Die Che-Proteine von *H. salinarum* dienen, wie auch bei Bakterien, zur Detektion von Umweltsignalen. Bei *H. salinarum* wird das Signal an die Proteine FlaCE/D weitergeleitet, die als Komponenten des Flagellenmotors postuliert wurden (Schlesner et al., 2009; Ghosh und Albers, 2011). Des Weiteren konnten durch systematische Genomanalysen drei neue Proteine identifiziert werden (OE2401F, OE2402F und OE2403R), die im Zusammenhang mit Chemotaxis stehen (Schlesner et al., 2009). Bei *P. furiosus* hingegen ist wenig über die Mechanismen der Chemotaxis bekannt. Versuche zur Veränderung der Schwimm- und Taumelfrequenz bei Zugabe eines Lock- bzw. Schreckstoffes scheiterten aufgrund eines bis dahin unzulänglichen experimentellen Systems (Herzog, 2009). Durch eine beheizbare Schwimmkammer, welche die Beobachtung von *P. furiosus*-Zellen unter anaeroben Bedingungen erlauben würde, könnten Chemotaxis-Experimente ermöglicht werden.

##### 4.3.3 De- und Repolymerisation

Es gibt in der Literatur viele Beispiele für Proteinstrukturen, die durch die Polymerisation von Monomeren entstehen, wie z.B. das Divisom aus FtsZ-Einheiten (Lan et al., 2009) oder die Typ IV-Pili aus Pilin-Untereinheiten (Proft und Parker, 2009). Bei letzteren spielt der hydrophobe N-Terminus, der auch innerhalb der Archaea konserviert ist (Kalmokoff et al., 1990), eine wichtige Rolle bei der Polymerisation der Monomere zum Filament (Hansen und Forest, 2006). Eine Voraussetzung für Polymerisationsstudien an den Flagellen von *P. furiosus* war, dass die Zellanhänge vollständig in Monomeren vorlagen. Da für die Flagellen eine hohe Hitzebeständigkeit nachgewiesen wurde (Näther et al., 2006), war eine thermische Denaturierung allein nicht ausreichend. Denn sogar nach zweistündiger Inkubation der Flagellen bei 121°C lagen immer noch 30-50 % der Zellanhänge in der Probe intakt vor (Näther et al., 2006). Dieser Befund erscheint vor dem Hintergrund einer optimalen Wachstumstemperatur von ca. 100°C bei *P. furiosus* als sinnvoll. Zur vollständigen Zerlegung der Flagellen war eine kombinierte Behandlung aus Hitze und Detergenz notwendig. Als besonders effizient stellte sich dabei das anionische Detergenz SDS (1 %, w/v) heraus, das im Gegensatz zu anderen Chemikalien wie Triton X-100, Harnstoff und Guanidinhydrochlorid zur vollständigen Zerlegung der Flagellen führte. Um das Detergenz von den Monomeren abzutrennen, wurden diese intensiv unter mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert. Es sei darauf hingewiesen, dass SDS durch Dialyse schwer entfernbar ist und in diesem Punkt nicht die optimale Wahl darstellte. Aus Mangel an adäquaten Alternativen musste jedoch auf dieses Detergenz zurückgegriffen werden.

Zur Ermittlung der Bedingungen für eine Repolymerisation der Flagellen von *P. furiosus* wurden die Monomere bei vier verschiedenen Temperaturen (8°C, 37°C, 60°C und 90°C) inkubiert. In Anbetracht der Möglichkeit, dass beim Zusammenbau der Flagellenfilamente eine ATPase



(FlaI) beteiligt sein könnte, wurde auch der Einfluss von ATP auf die Polymerisation untersucht. Bei dieser ATPase, für die im Fall von *S. solfataricus* eine ATP-Hydrolyse *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Pretz et al., 2005), handelt es sich um ein Homologes zu PilB/PilT aus dem Typ IV-Pili System (Peabody et al., 2003). Bei der Analyse der Temperaturansätze über SDS-PAGE konnte bereits nach einem Tag Inkubation bei 60°C und 90°C ein Bandenshift detektiert werden. Dieser äußerte sich darin, dass die 30 kDa-Bande der Monomere verschwunden war und stattdessen eine knapp unterhalb der Grenze zum Sammelgel gelegene Bande auftrat. In den entsprechenden Proben waren zahlreiche Proteinaggregate enthalten, die nach der Denaturierung und Dialyse der Flagellen nicht vorhanden gewesen waren. In seltenen Fällen konnten im TEM Strukturen detektiert werden, die Ähnlichkeiten zu Flagellen aufwiesen. Auch der ermittelte Durchmesser von ca. 11 nm deckte sich in etwa mit dem nativer Flagellen, welcher bei etwa 13 nm liegt. Bei allen Versuchen konnte kein positiver Einfluss von ATP auf das Ergebnis festgestellt werden. Auch zweiwertige Ionen, die dem Puffer zugesetzt wurden, zeigten keine Wirkung auf das Versuchsergebnis.

Dass in der Membran von *P. furiosus* Komponenten enthalten sein könnten, die beim Aufbau der Flagelle eine Rolle spielen, wurde aus verschiedenen Untersuchungen an *S. solfataricus*, *H. salinarum* und *Methanococcus maripaludis* gefolgert. Aus diesen ging hervor, dass ein Membranprotein (FlaJ) besonders wichtig ist für das Arrangement der Zellanhänge. Für FlaJ wurde eine Assoziation mit der ATPase FlaI vorhergesagt, die in einer *Assembly*-Plattform resultieren soll. Obwohl die exakte Rolle der Fla-Proteine FlaG, FlaF, FlaH, FlaI und FlaJ nicht genau verstanden ist, ist bekannt, dass jedes von ihnen zum Aufbau der Flagellen benötigt wird (Patenge et al., 2001; Chaban et al., 2007; Zolghadr et al., 2010). Detaillierte Analysen zur zellulären Lokalisation der Fla-Proteine bei *M. voltae* zeigten auf, dass FlaB1, FlaB2, FlaC, FlaD, FlaE, FlaH und FlaI in den Membranfraktionen enthalten waren (obwohl einige auch im Cytoplasma vorkamen; Thomas und Jarrell, 2001). Die genannten Gründe führten zu einem Versuchsansatz, in dem die Monomere mit einer S-Layer Präparation von *P. furiosus* versetzt wurden. Doch auch hier konnten keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden, außer dem bereits beobachteten Bandenshift in Verbindung mit der Bildung von Proteinaggregaten.

Dass die Zellanhänge eines Archaeums *in vitro* polymerisieren können, wurde im Fall von *Ig-nicoccus hospitalis* nachgewiesen (Meyer, 2010). Dort wurde allerdings eine rekombinant erzeugte Variante des Fiberproteins Iho670 als Monomer verwendet, und nicht, wie in dieser Arbeit, eine Präparation aus nativen Zellanhängen. Es sollte damit jedoch klar sein, dass dieses Ereignis prinzipiell *in vitro* stattfinden kann. Zusammenfassend sind aufgrund der Komplexität des Vorganges weiterführende Studien bezüglich der Polymerisation der Flagellen von *P. furiosus* nötig.

### 4.3.4 Klonierung und Northern Blotting

Zur Klonierung und Expression von *flaB0* wurden zwei verschiedene konventionelle Systeme (Impact und pET) verwendet. Eine Expression des Proteins konnte damit jedoch nur zu geringem Ausmaß erzielt werden, auch wenn verschiedene Versuchsparameter variiert wurden. Von Problemen bei der Expression rekombinanter Flagelline war bereits mehrfach berichtet worden, welche auch bei Verwendung eines eukaryontischen Expressionssystems nicht umgangen werden konnten (Dietl, 2006; Wimmer, 2007). Manche Gene, deren Produkte toxisch auf *E. coli* wirken, können mit konventionellen Methoden nicht kloniert werden. Bei den Flagellinen steht der hydrophobe N-Terminus unter Verdacht, für die Toxizität verantwortlich zu sein. Jedoch konnte in dieser Arbeit auch eine Genvariante von FlaB0 ohne das N-terminale Signalpeptid nicht exprimiert werden. Für eine erfolgreiche Expression von FlaB0 sollte deswegen in Zukunft auf ein anderes genetisches System zurückgegriffen werden. Anbieten würde sich hierfür ein archaeelles System, wie das von *Thermococcus* (Sato et al., 2005; Takemasa et al., 2011) oder *Pyrococcus* (Waage et al., 2010).

Northern Blotting als Methode zum Nachweis bestimmter Transkripte wurde für *M. thermoautotrophicus* erfolgreich angewendet, wodurch gezeigt werden konnte, dass das Fimbringen *mth60* Teil zweier Operone ist (Sarbu, 2009). Auch die *fla*-Gene von *P. furiosus* liegen geclustert in einem Operon vor (Näther, 2007). Eine Quantifizierung der Transkripte stand jedoch noch aus. Für *flaB0* von *P. furiosus* konnte ein Signal auf der Höhe von ca. 600 bp mehrfach sowohl bei RNA aus der exponentiellen, als auch aus der stationären Phase des Wachstums nachgewiesen werden. Obwohl alle anderen Sonden im Dot-Blot positiv reagierten, konnten damit im Northern Blot keine Transkripte detektiert werden. Die Gründe dafür können vielfältig sein: Erstens kann RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen schnell degradiert werden. Eine Degradierung zeigt sich bei der Gelelektrophorese der Nukleinsäuren durch die Existenz eines Schmiere, was bei geblotteter RNA jedoch nicht mehr nachvollziehbar ist. Da der experimentelle Ablauf sich vom Gellauf bis hin zur Detektion über einen Zeitraum von drei Tagen erstreckte, konnte trotz Vorsichtsmaßnahmen eine Kontamination mit RNasen nie ganz ausgeschlossen werden. Zweitens ist die Stringenz der Waschschrte nach der Sonden-Hybridisierung wichtig für das spätere Ergebnis. Bei zu hoher Stringenz können nicht nur ungebundene RNA-Sonden, sondern auch die RNA selbst von der Membran weg gewaschen werden. Drittens ist das hier verwendete Detektionssystem, bei dem es sich um eine nicht-radioaktive chemilumineszente Reaktion handelt, zwar einfach im Umgang, aber weitaus weniger sensibel als eine Detektion mit radioaktiv markierten Sonden. Zu diesem Punkt sei angemerkt, dass bereits früher unter Verwendung radioaktiver Sonden keine Transkripte nachgewiesen werden konnten (Näther, 2007). Zur Quantifizierung von Transkripten des *fla*-Operons von *P. furiosus* sollte deswegen in Zukunft Real-time quantitative PCR verwendet werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

*P. furiosus* ist ein Modellorganismus zum Studium der Zellanhänge hyperthermophiler Archaeen. In dieser Arbeit wurden flagellenvermittelte Interaktionen untersucht, indem *P. furiosus* in Cokultur mit dem methanogenen *M. kandleri* auf Basis eines vermeintlichen interspezies-H<sub>2</sub>-Transfers gezüchtet wurde. Es zeigte sich, dass der Anteil an H<sub>2</sub> in der Gasphase eine maßgebliche Auswirkung auf die Organismen in der Cokultur hatte. Ein Überschuss oder Mangel von H<sub>2</sub> bewirkte, dass die Etablierung einer Cokultur, von der beide Organismen profitierten, fehl schlug. Nur in einer Gasphase, die 15 % H<sub>2</sub> (v/v) enthielt, wurde das Wachstum beider Organismen stimuliert. Die Entwicklung des Bi-Spezies Biofilms konnte innerhalb eines Zeitraums von 15 h dokumentiert werden und die Biofilmstruktur mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper dargestellt werden. Durch die Signalverstärkung beim Einsatz eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers war auch die Darstellung der Flagellen von *P. furiosus* möglich, welche durch direkte Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor® nicht erzielt werden konnte. In einer weiteren Studie wurden zwei *P. furiosus*-Stämme, der *Laborstamm* (= laufende Laborkultur) und der *Typstamm* (= Stamm Vc1 aus der Bakterienbank Regensburg) auf ihr Adhäsionsverhalten an verschiedene Materialien, vor allem Glas, getestet. Dabei stellte sich heraus, dass bei Laborkulturen durch laufend wiederholte Überimpfungen und Adhäsionstests eine Selektion hin zum Wachstum auf Oberflächen stattfindet. Zur Aufreinigung der Flagellen von *P. furiosus* wurden verschiedene Strategien verfolgt. Dabei lieferte die Solubilisierung mit DDM, einem milden Detergenz, das auch zur Gewinnung von Membranproteinen verwendet wird, das beste Ergebnis. Mit dieser Methode konnten gut erhaltene, intakte Flagellen mit basalen (potentiellen) Verankerungsstrukturen präpariert werden. Dabei handelte es sich um ringförmige Proteine, die mehrheitlich frei, aber auch mit Flagellen assoziiert vorkamen. Es besteht ein hinreichender Verdacht, dass die ringförmigen Proteine ihren Ursprung in den *Tubes* finden. Diese pseudokristallinen Strukturen kommen geclustert vor und sind vermutlich innen hohl. Über Transmissionselektronenmikroskopie konnte in Ultradünnschnitten von *P. furiosus*-*Laborstamm* eine elektronendichte Linie unterhalb der Cytoplasmamembran dargestellt werden, die sich am Zellpol befand. Diese Struktur könnte der Zelle Stabilität in der Region des Flagellenaustritts verschaffen oder als membrandurchspannender Komplex der Chemotaxis dienen. Durch die Behandlung von Flagellen mit verschiedenen Detergenzien zeigte sich, dass sich SDS am besten eignete, um die Zellanhänge komplett in ihre Monomere zu zerlegen. In anschließenden Polymerisationsstudien mit den so erhaltenen Monomeren wurde das Auftreten von Proteinaggregaten, sowie Flagellen-ähnlicher Strukturen im TEM nachgewiesen.

## 6 ANHANG

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß den IUPAC-Richtlinien verwendet.

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
μF	Mikrofarad
AA	Acrylamid
AF	AlexaFluor®
AK (1° bzw. 2°)	Antikörper (primärer bzw. sekundärer)
Anti-Mka OP	Antikörper gegen Oberflächenproteine von <i>M. kandleri</i>
Anti-Pfu OP	Antikörper gegen Oberflächenstrukturen von <i>P. furiosus</i>
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscope</i>
CsCl	Cäsiumchlorid
Goat anti-rabbit PO	Sekundärer Antikörper, der mit Peroxidase gekoppelt ist
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton = 1000 g/mol
kV	Kilovolt
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i> (Molekulargewichtstrenngrenze)
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (Wasserstoff-Exponent)
REM	Rasterelektronenmikroskop
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
S-Layer	<i>Surface Layer</i>
Abkürzung	Bedeutung
SME	Synthetisches Meerwasser
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TOF	<i>Time of flight</i>
U	Unit
UAc	Uranylacetat
ün	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	<i>volume per volume</i>
Vol.	Volumenanteil
w/v	<i>weights per volume</i>
z.T.	zum Teil

## 6.2 Sequenzen der Flagelline

### FlaB0

MAKKGAVGIGTLIVFIAMVLVA AVAAVLIQTSGYLQQKSQATGAETTQEVASGIKVL SVVGKTD SNKTYV  
 EKLA IYISP NAGSEQIDLNNTRVVLSNGTVQAVLKY EKTAYHKGAVGDVFNASTAWNLSNTNFGIIVLQDA  
 DNSVDQNYPTLNKGDIVVITVKVGE GNGVFGKGIPRRTKITGKVIPEFQAPGVIEFTTPSTYTSEVIELQ

### FlaB1

VRKGAIGIGTLIVFIAMVLVA AVAAGVIIGTAGYLQQKAQAAGRQTTQEVASGIKIVNVFGYINATPPSNGTIV  
 KMAIFVTPNAGSSGIDLSNVKVLSDGKKLVVYNYS GELYTGKILDFNL PVWNNTKNGTFSIAVVNDVGS  
 KMEDTHPTLEWGDTVALLLRDDVFNYKSKNGIGPSTRIIGKVIPDAGAAGVIDFTTPPTFEYNVIELQ

### FlaB2

MKKGAIGIGTLIVFIAMVLVA AVAAGVLIATSGYLQQKAMATGRQTTQEVASGIKVTGVFGYINGTPPGASN  
 ISRIVIYVAPNAGSSGIDLRVVKIVLSDGKRMAVYRYD PKEDGSSDLKPEYIHYKGDIPNIFAYGEWEPYY  
 KNKKPQISGEYITDNINVS AVWWNLYSAYNNSSKLLFGIAVVQDGDNSLSDPQHPTLSWGD LAALMIWTF  
 PFDDNNISNGFGLRPGTKIIGKVIPESGAAGVIDFTTPSTYTQNL MELQ



### 6.3 Sequenzierung des 16S rRNA-Gens von *P. furiosus* Laborstamm

Erhaltene Sequenz (Primer1406uR)

```
CGCGGGTACTAGGGATTCCAGCTTCACGCGGGGCGAGTTGCAGCCCGCGATCCGAACTGAGGGCGG
GTTTAGGGGATTCCCTTCCCCTTTTCGGGGTCGGGTCCCATTGTCCCGCCCATTGTAGCGCGCGTGT
AGCCCGGGGGTTTCGGGGCATACTGACCTACCGTCGCCCGCCCCTTCCTCCGGCTTATCGCCGGC
AGTCCCCCAGAGTGCCTCCCTCCCGAGCGGGAGGGACTGGCAACTGGGGGCGCGGGTCTCGCT
CGTTACCACACTTAAGTGGACGCCTCACGGTACGAGCTGACGGCGGCCATGCACCTCCTCTCGGCG
CGTCCGGCAAGACCTTCAGCCTGGCCTTCATCCTGCCGTCGCCCGCGGTGAGGTTCCCGGCGTTG
AATCCAATTAACCGCACGCTCCACCCCTTGATGTCTCCCCGCCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCTT
GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGCGGGCTTAACGGCTTCCCTACGGCACCGGGCGAGCTCGAAGCTC
GCCCCACACCTAGCCCGCATCCTTTACAGCCAGGACTACCCGGGTATCTAATCCGGTTCGCTCCCC
TGGCCTTCGGCCCTCACCGTCGGACCCGTTCCAGCCGGGCGCCTTCGCCACTGGCGGTCCCCCGG
GGATATAGGATTTACCCCTACCCCGGGGGTACCCCGGGCCTCTCCCGGTCCCAAGGCCCGCAG
TATCCCCAGCGANNCCACGGNNGANCCNNGGGATTTCNCCNNNNNTTANNG
```

Blast-Alignment

<b>Accession</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Sequenz- abdeckung</b>	<b>e- value</b>	<b>max. Sequenz- identität</b>
AB603518.1	<i>Pyrococcus furiosus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 8422	85%	0.0	98%
FJ862776.1	<i>Pyrococcus</i> sp. GIL small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	98%
AE009950.1	<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638, complete genome	85%	0.0	98%
EU682399.1	<i>Pyrococcus</i> sp. CH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	98%
AB235311.1	<i>Pyrococcus</i> sp. 95-12-1 gene for 16S rRNA, partial sequence	85%	0.0	98%

**Tabelle 6-1: Darstellung der fünf besten Treffer im Sequenzalignment mit dem Programm Blast.**

## 6.4 Curriculum Vitae

### Personal Details

---

<b>Name</b>	Simone Schopf
<b>Date of birth</b>	22 January 1980
<b>Place of birth</b>	Regen, Germany
<b>Family status</b>	unmarried, one child
<b>Major subject</b>	Microbiology

### Work experience

---

<b>2010</b>	research associate Project "Pyroglue"
<b>2007–2010</b>	PhD student at the University of Regensburg PhD thesis: "Untersuchungen der Flagellen von <i>Pyrococcus furiosus</i> : Flagellenvermittelte Interaktionen, Ultrastruktur und Molekularbiologie"

### Education

---

<b>02/2006–12/2006</b>	Graduate student of Biological Sciences at University of Regensburg Diploma thesis: "Interaktionen von <i>Pyrococcus furiosus</i> mit biotischen und abiotischen Oberflächen"
<b>2001–2006</b>	Undergraduate student of Biological Sciences at Regensburg University
<b>1999–2001</b>	Study of dental medicine at Regensburg University
<b>1990–1999</b>	Landgraf-Leuchtenberg-Gymnasium (grammar school), Grafenau, Germany

### Additional Education

---

<b>03/2007</b>	Advanced training "Gentechnikfortbildung nach §§ 15 und 17 der Gentechnik-sicherheitsverordnung"
<b>Since 2007</b>	Supervision of undergraduates during the practical course "Organismische Mikrobiologie II"
<b>04/2005–05/2005</b>	Student assistant at the chair of microbiology
<b>11/2003–12/2003</b>	Industrial training at Dorfner Analysenzentrum und Anlagenplanungs GmbH (Hirschau, Germany)

## 6.5 Publikationen

Schopf, S., Wanner, G., Rachel, R., and Wirth, R. (2008). An archaeal bi-species biofilm formed by *Pyrococcus furiosus* and *Methanopyrus kandleri*. *Arch. Microbiol.* 190, 371-377.

Rachel, R., Meyer, C., Klingl, A., Gürster, S., Heimerl, T., Wasserburger, N., Burghardt, T., Küper, U., Bellack, A., Schopf, S., Wirth, R., Huber, H., and Wanner, G. (2010). Analysis of the ultrastructure of archaea by electron microscopy. *Methods Cell. Biol.* 96, 47-69.

Wirth, R., Bellack, A., Bertl, M., Bilek, Y., Heimerl, T., Herzog, B., Leisner, M., Probst, A., Rachel, R., Sarbu, C., Schopf, S., and Wanner, G. (2011). The Mode of Cell Wall Growth in Selected Archaea Follows the General Mode of Cell Wall Growth in Bacteria - An Analysis using Fluorescent Dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1556-1562.

## 6.6 Tagungsbeiträge

Schopf, S., Näther, D.J., Wanner, G., Rachel, R. and Wirth, R. (2007). Interactions of *Pyrococcus furiosus* with biotic and abiotic surfaces-Establishment of an archaeal, hyperthermophilic coculture. *Poster presentation* at VAAM, Osnabrück.

Schopf, S., Rachel, R. Wanner, G. and Wirth, R. (2009). Purification of *Pyrococcus furiosus* flagella and approaches to clone the major flagellin. *Poster presentation* at VAAM, Bochum.

Schopf, S., Herzog, B., Rachel, R. Wanner, G. and Wirth, R. (2009). Functional and Structural analyses of *Pyrococcus furiosus* flagella. *Talk* at RZBB-Symposium, Kostenz.

Schopf, S., Herzog, B., Rachel, R. Wanner, G. and Wirth, R. (2009). Motility in *Pyrococcus furiosus*. *Talk* at Archaea-Tagung "Genome function and Gene regulation in Archaea", Schmitten.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, M.W.W. (1990). The metabolism of hydrogen by extremely thermophilic, sulfur-dependent bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 75, 219–238.
- Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Bardy, S.L. and Jarrell, K.F. (2003). Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol. Microbiol.* 50, 1339–1347.
- Bardy, S.L., Mori, T., Komoriya, K., Aizawa, S. and Jarrell, K.F. (2002). Identification and localization of flagellins FlaA and FlaB3 within flagella of *Methanococcus voltae*. *J. Bacteriol.* 184, 5223–33.
- Bardy, S.L., Ng, S.Y.M. and Jarrell, K.F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology.* 149, 295–304.
- Bardy, S.L., Ng, S.Y.M. and Jarrell, K.F. (2004). Recent advances in the structure and assembly of the archaeal flagellum. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 41–51.
- Barth, T. (2008). Untersuchungen zur Anheftung von *Pyrococcus furiosus* an feste Oberflächen über seine Flagellen. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Bayley, D.P. and Jarrell, K.F. (1998). Further evidence to suggest that archaeal flagella are related to bacterial type IV Pili. *J. Mol. Evol.* 46, 370–373.
- Bellack, A., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G. and Wirth, R. (2010 a). *Methanocaldococcus villosus* sp. nov., a heavily flagellated archaeon adhering to surfaces and forming cell-cell contacts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *Epub ahead of print*.
- Bellack, A., Loose, J., Probst, A., Rachel, R., Wanner, G. and Wirth, R. (2010 b). A closer investigation of flagella and membrane proteins of *Pyrococcus furiosus*. *Poster presentation at VAAM, Hannover*.
- Bennett-Lovsey, R.M., Herbert, A.D., Sternberg, M.J. and Kelley, L.A. (2008). Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins.* 70, 611–625.
- Berg, H.C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 19–54.
- Blum, H. and Beier, H.G.H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8, 93–99.
- Bonch-Osmolovskaya, E.A. and Stetter, K.O. (1991). Interspecies hydrogen transfer in cocultures of thermophilic archaea. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 205–208.
- Burggraf, S., Fricke, H., Neuner, A., Kristjansson, J., Rouvier, P., Mandelco, L., Woese, C.R., and Stetter K.O. (1990). *Methanococcus igneus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen from a shallow submarine hydrothermal system. *Syst. Appl. Microbiol.* 13, 263–269.
- Calo, D., Kaminski, L. and Eichler, J. (2010). Protein glycosylation in archaea: sweet and extreme. *Glycobiology.* 20, 1065–1076.
- Chaban, B., Ng, S.Y., Kanbe, M., Saltzman, I., Nimmo, G., Aizawa, S. and Jarrell, K.F. (2007). Systematic deletion analyses of the *fla* genes in the flagella operon identify several genes essential for proper assembly and function of flagella in the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Mol. Microbiol.* 66, 596–609.

- Cohen-Krausz, S. and Trachtenberg, S. (2002). The structure of the archeabacterial flagellar filament of the extreme halophile *Halobacterium salinarum* R1M1 and its relation to eubacterial flagellar filaments and type IV pili. *J. Mol. Biol.* 321, 383–395.
- Cohen-Krausz, S. and Trachtenberg, S. (2008). The flagellar filament structure of the extreme acidothermophile *Sulfolobus shibatae* B12 suggests that archaeabacterial flagella have a unique and common symmetry and design. *J. Mol. Biol.* 375, 1113–1124.
- Collins, R.F., Frye, S.A., Balasingham, S., Ford, R.C., Tønjum, T. and Derrick, J.P. (2005). Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ. *J. Biol. Chem.* 280, 18923–18930.
- Craig, L. and Li, J. (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 267–277.
- Dietl, K. (2006). Untersuchung des Flagellins von *Pyrococcus furiosus*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Stetter, K.O., Huber, H., Huber, R. and Steinbacher, S. (1998). Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell.* 93, 125–138.
- Esteban, J., Molina-Manso, D., Spiliopoulou, I., Cordero-Ampuero, J., Fernández-Roblas, R., Foka, A. and Gómez-Barrena, E. (2010). Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. *Acta. Orthop.* 81, 674–679.
- Faguy, D.M., Jarrell, K.F., Kuzio, J. and Kalmokoff, M.L. (1994). Molecular analysis of archael flagellins: similarity to the type IV pilin-transport superfamily widespread in bacteria. *Can. J. Microbiol.* 40, 67–71.
- Fiala, G. and Stetter, K.O. (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* 145, 56–61.
- Filoche, S., Wong, L. and Sissons, C.H. (2010). Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J. Dent. Res.* 89, 8–18.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R. and Bateman, A. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 38 (Suppl 1), D211–D222.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. (2001). Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in unserer Zeit.* 31, 160–180.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633.
- Fröls, S., Ajon, M., Wagner, M., Teichmann, D., Zolghadr, B., Folea, M., Boekema, E.J., Driessen, A.J.M., Schleper, C. and Albers, S.-V. (2008). UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Mol. Microbiol.* 70, 938–952.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The Proteomics Protocols Handbook* (John M. Walker, ed.), 571–607.
- Ghosh, A. and Albers, S.-V. (2011). Assembly and function of the archaeal flagellum. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 64–69.
- Glaeser, J. and Overmann, J. (2004). Biogeography, evolution, and diversity of epibionts in phototrophic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4821–4830.
- Gottenbos, B., van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. (2000). Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 50, 208–214.



- Greve, H., de Wyna, L. and Bouckaert, J. (2007). Combining sites of bacterial fimbriae. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 506-512.
- Gupta, R. and Brunak, S. (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and correlation to protein function. *Pac. Symp. Biocomput.* 7, 310-322.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95-108.
- Hansen, J.K. and Forest, K.T. (2006). Type IV pilin structures: insights on shared architecture, fiber assembly, receptor binding and type II secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11, 192-207.
- Herzog, B. (2009). Vergleichende Analyse des Schwimmverhaltens verschiedener Archaeen. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Hirokawa, T. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* 14, 378-379.
- Hixon, W.G. and Searcy, D.G. (1993). Cytoskeleton in the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*? Viscosity increase in soluble extracts. *BioSystems.* 29, 151-160.
- Janker, C. (2008). Anheftung ausgewählter Archaeen an unterschiedliche Oberflächen inkl. Literaturrecherche zu Zellanhängen von Bakterien. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Jarrell, K.F. and Koval, S.F. (1989). Ultrastructure and biochemistry of *Methanococcus voltae*. *Crit. Rev. Microbiol.* 17, 53-87.
- Jarrell, K.F. and McBride, M.J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 466-476.
- Jogler, C., Wanner, G., Kolinko, S., Niebler, M., Amann, R., Petersen, N., Kube, M., Reinhardt, R. and Schüler, D. (2011). Conservation of proteobacterial magnetosome genes and structures in an uncultivated member of the deep-branching *Nitrospira phylum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1134-1139.
- Johnson, M.R., Montero, C.I., Connors, S.B., Shockley, K.R., Bridger, S.L. and Kelly, R.M. (2005). Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol. Microbiol.* 55, 664-674.
- Kaiser, D. (2008). *Myxococcus*-from single-cell polarity to complex multicellular patterns. *Annu. Rev. Genet.* 42, 109-130.
- Kalmokoff, M.L., Jarrell, K.F. and Koval, S.F. (1988). Isolation of flagella from the archaeobacterium *Methanococcus voltae* by phase separation with Triton X-114. *J. Bacteriol.* 170, 1752-1758.
- Kalmokoff, M.L., Karnauchow, T.M. and Jarrell, K.F. (1990). Conserved N-terminal sequences in the flagellins of archaeobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 154-160.
- Katsikogianni, M. and Missirlis, Y.F. (2004). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cell. Mater.* 8, 37-57.
- Kattenbeck, B. (1992). Elektronenmikroskopische Charakterisierung von Oberflächenproteinen hyperthermophiler Archaea: *Methanopyrus kandleri* und *Pyrodictium abyssi*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Kim, S., Willison, K.R. and Horwich, A.L. (1994). Cytosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. *Trends Biochem. Sci.* 19, 543-548.

- Kim, S.R. and Komano, T. (1997). The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus. *J. Bacteriol.* **179**, 3594–3603.
- Klingl, A. (2011). Charakterisierung des Surface (S-) Layer von *Acidithiobacillus ferrooxidans* SP5/1 und *Acidithiobacillus striatothermus* HV2/2, spec. nov.: Struktur, Funktion und Notwendigkeit des S-Layer Proteins Slp90 in *Acidithiobacillus*. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Koerdt, A., Gödeke, J., Berger, J., Thormann, K.M. and Albers, S.-V. (2010). Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions. *PLoS ONE* **5**, e14104.
- Kolenbrander, P.E. (2000). Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 413-437.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567-580.
- Kupper, J., Marwan, W., Typke, D., Grünberg, H., Uwer, U., Gluch, M. and Oesterhelt, D. (1994). The flagellar bundle of *Halobacterium salinarum* is inserted into a distinct polar cap structure. *J. Bacteriol.* **176**, 5184-5187.
- Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H.W., Fricke, H., Trincone, A., Kristjansson, J.K. and Stetter, K.O. (1991). *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch. Microbiol.* **156**, 239-247.
- Küper, U., Meyer, C., Müller, V., Rachel, R. and Huber, H. (2011). Energized outer membrane and spatial separation of metabolic processes in the hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3152-3156.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **10**, 203–209.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
- Lai, E.M. and Kado, C.I. (2002). The *Agrobacterium tumefaciens* T pilus composed of cyclic T pilin is highly resilient to extreme environments. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**, 111-114.
- Lan, G., Daniels, B.R., Dobrowsky, T.M., Wirtz, D. and Sun, S.X. (2009). Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 121-126.
- Lehti, T.A., Bauchart, P., Heikkinen, J., Hacker, J., Korhonen, T.K., Dobrindt, U. and Westerlund-Wikström, B. (2010). Mat fimbriae promote biofilm formation by meningitis-associated *Escherichia coli*. *Microbiology. (Reading, Engl.)*. **156**, 2408-2417.
- Logan, S.M. (2006). Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire? *Microbiology.* **152**, 1249-1262.
- Lund, P. (2011). Insights into chaperonin function from studies on archaeal thermosomes. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 94-98.
- Macnab, R.M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 77-100.
- Maddock, J.R. and Shapiro, L. (1993). Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science.* **259**, 1717-1723.
- Maeder, D.L., Weiss, R.B., Dunn, D.M., Cherry, J.L., González, J.M., DiRuggiero, J. and Robb, F.T. (1999). Divergence of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *P. horikoshii* inferred from complete genomic sequences. *Genetics.* **152**, 1299-1305.
- Mattick, J.S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 289–314.

- Mattick, J.S., Whitchurch, C.B. and Alm, R.A. (1996). The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Gene* 179, 147–155.
- Metlina, A.L. (2004). Bacterial and archaeal flagella as prokaryotic motility organelles. *Biochemistry Mosc.* 69, 1203-1212.
- Meyer, C. (2010). Die Fibers von *Ignicoccus hospitalis*: Ultrastruktur, Verankerung und molekularbiologische Untersuchungen. Dissertation an der naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.
- Moissl, C., Rachel, R., Briegel, A., Engelhardt, H. and Huber, R. (2005). The unique structure of archaeal 'hami', highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. *Mol. Microbiol.* 56, 361–370.
- Moran, N.A. (2006). Symbiosis. *Curr. Biol.* 16, R 866-871.
- Müller, D.W., Meyer, C., Gürster, S., Küper, U., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R. and Bellack, A. (2009). The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage. *J. Bacteriol.* 191, 6465–6468.
- Muralidharan, V., Rinker, K.D., Hirsh, I.S., Bouwer, E.J. and Kelly, R.M. (1997). Hydrogen transfer between methanogens and fermentative heterotrophs in hyperthermophilic cocultures. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 268–278.
- Näther, D. (2007). Untersuchung der Flagellen von *Pyrococcus furiosus*. Dissertation an der naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.
- Näther, D.J., Rachel, R., Wanner, G. and Wirth, R. (2006). Flagella of *Pyrococcus furiosus*: multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts. *J. Bacteriol.* 188, 6915–6923.
- Nayak, N., Satpathy, G., Nag, H.L., Venkatesh, P., Ramakrishnan, S., Nag, T.C. and Prasad, S. (2011). Slime production is essential for the adherence of *Staphylococcus epidermidis* in implant-related infections. *J. Hosp. Infect.* 77, 153-156.
- Ng, S.Y.M., Chaban, B. and Jarrell, K.F. (2006). Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11, 167–191.
- Ng, S.Y.M., Zolghadr, B., Driessen, A.J.M., Albers, S.-V. and Jarrell, K.F. (2008). Cell surface structures of archaea. *J. Bacteriol.* 190, 6039–6047.
- Nickell, S., Hegerl, R., Baumeister, W. and Rachel, R. (2003). *Pyrodictium cannulae* enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryoelectron tomography. *J. Struct. Biol.* 141, 34–42.
- Okahashi, N., Nakata, M., Terao, Y., Isoda, R., Sakurai, A., Sumitomo, T., Yamaguchi, M., Kimura, R.K., Oiki, E. and Kawabata, S. (2011). Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microbial pathogenesis.* 50, 148-154.
- Ottow, J.C.G. (1975). Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu. Rev. Microbiol.* 29, 79-108.
- Paggi, R.A., Martone, C.B., Fuqua, C. and DeCastro, R.E. (2003). Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 49-51.
- Patenge, N., Berendes, A., Engelhardt, H., Schuster, S.C. and Oesterhelt, D. (2001). The fla gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*. *Mol. Microbiol.* 41, 653–663.
- Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P. and Saier, M.H. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology.* 149, 3051-3072.

- Pratt, L.A. and Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30, 285-293.
- Pretz, M.G., Remigy, H., Swaving, J., Albers, S.-V., Garrido, V.G., Chami, M., Engel, A. and Driessen, A.J. (2005). Functional and structural characterization of the minimal Sec translocase of the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *Extremophiles*. 9, 307-316.
- Proft, T. and Baker, E.N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life. Sci.* 66, 613-635.
- Robb, F.T., Maeder, D.L., Brown, J.R., DiRuggiero, J., Stump, M.D., Yeh, R.K., Weiss, R.B. and Dunn, D.M. (2001). Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Meth. Enzymol.* 330, 134-157.
- Roche, R.J. and Moxon, E.R. (1992). The molecular study of bacterial virulence: a review of current approaches, illustrated by the study of adhesion in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pediatr. Nephrol.* 6, 587-596.
- Sarbu, C. (2009). Liegt das Fimbringen mth60 von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* in einem Operon? Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Sasahara, K.C. and Zottola, E.A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism inflowing systems. *J. Food Prot.* 56, 1022-1028.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T. (2005). Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3889-3899.
- Saxton, W.O., Baumeister, W. and Hahn, M. (1984). Three-dimensional reconstruction of imperfect two-dimensional crystals. *Ultramicroscopy*. 13, 57-70.
- Schäffer, C. and Messner, P. (2001). Glycobiology of surface layer proteins. *Biochemie*. 83, 591-599.
- Schägger, H. and van Jargow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Scheuerman, T.R., Camper, A.K. and Hamilton, M.A. (1998). Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion. *J. Colloid. Interface. Sci.* 208, 23-33.
- Schlesner, M., Miller, A., Streif, S., Staudinger, W.F., Muller, J., Scheffer, B., Siedler, F. and Oesterhelt, D. (2009). Identification of Archaea-specific chemotaxis proteins which interact with the flagellar apparatus. *BMC Microbiol.* 9, 56.
- Schopf, S. (2006). Interaktionen von *Pyrococcus furiosus* mit biotischen und abiotischen Oberflächen. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Schopf, S., Wanner, G., Rachel, R. and Wirth, R. (2008). An archaeal bi-species biofilm formed by *Pyrococcus furiosus* and *Methanopyrus kandleri*. *Arch. Microbiol.* 190, 371-377.
- Sourjik, V. and Armitage, J.P. (2010). Spatial organization in bacterial chemotaxis. *EMBO J.* 29, 2724-2733.
- Schuster, K.U. (2003). Der Surface-Layer von *Nanoarchaeum equitans*: Elektronenmikroskopische, proteinbiochemische und immunologische Untersuchungen. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Searcy, D.G. and Hixon, W.G. (1991). Cytoskeletal origins in sulfur-metabolizing archaeobacteria. *BioSystems*. 25, 1-11.

- Shimoyama, T., Kato, S., Ishii, S. and Watanabe, K. (2009). Flagellum mediates symbiosis. *Science*. 32, 1574.
- Skidmore, J.M., Ellefson, D.D., McNamara, B.P., Couto, M.M., Wolfe, A.J. and Maddock, J.R. (2000). Polar clustering of the chemoreceptor complex in *Escherichia coli* occurs in the absence of complete CheA function. *J. Bacteriol.* 182, 967-973.
- Speranza, G., Gottardi, G., Pederzoli, C., Lunelli, L., Canteri, R., Pasquardini, L., Carli, E., Lui, A., Maniglio, D. and Brugnara, M. (2004). Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*. 25, 2029-2037.
- Stetter, K.O., Koenig, H.M. and Stackebrandt, E. (1983). *Pyrodictium* gen.nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105 degree C. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 535–551.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. and Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W. (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5608-5613.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130.
- Szabó, Z., Sani, M., Groeneveld, M., Zolghadr, B., Schelert, J., Albers, S.-V., Blum, P., Boekema, E.J. and Driessen, A.J.M. (2007). Flagellar motility and structure in the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 189, 4305–4309.
- Szurmant, H. and Ordal, G.W. (2004). Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 301-319.
- Takemasa, R., Yokooji, Y., Yamatsu, A., Atomi, H. and Imanaka, T. (2011). Application of *Thermococcus kodakarensis* as a host for gene expression and protein secretion. *Appl. Environ. Microbiol.* *Epub ahead of print*.
- Taylor, R.G., Walker, D.C. and McInnes, R.R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic. Acids Res.* 7, 1677–1678.
- Thoma, C. (2005). Charakterisierung der Zellanhänge von *Methanothermobacter thermoauto-trophicus*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Thoma, C., Frank, M., Rachel, R., Schmid, S., Näther, D., Wanner, G. and Wirth, R. (2008). The Mth60 fimbriae of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* are functional adhesins. *Environ. Microbiol.* 10, 2785–2795.
- Thomas, N.A. and Jarrell, K.F. (2001). Characterization of flagellum gene families of methanogenic archaea and localization of novel flagellum accessory proteins. *J. Bacteriol.* 183, 7154-7164.
- Thomas, N.A., Bardy, S.L. and Jarrell, K.F. (2001). The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 147–174.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.



- Trent, J.D., Kagawa, H.K., Yaoi, T., Olle, E. and Zaluzec, N.J. (1997). Chaperonin filaments: the archaeal cytoskeleton? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5383-5388.
- Triandafillu, K., Balazs, D.J., Aronsson, B.O., Descouts, P., Tu Quoc, P., van Delden, C., Mathieu, H.J. and Harms, H. (2003). Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly(vinyl chloride) (PVC) from endotracheal intubation devices. *Biomaterials*. **24**, 1507-1518.
- Voisin, S., Houliston, R.S., Kelly, J., Brisson, J.R., Watson, D., Bardy, S.L., Jarrell, K.F. and Logan, S.M. (2005). Identification and characterization of the unique N-linked glycan common to the flagellins and S-layer glycoprotein of *Methanococcus voltae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 16586–16593.
- Waage, I., Schmid, G., Thumann, S., Thomm, M. and Hausner W. (2010). Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3308-3313.
- Wall, D. and Kaiser, D. (1999). Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.* **32**, 1–19.
- Wanner, G., Vogel, K. and Overmann, J. (2008). Ultrastructural characterization of the prokaryotic symbiosis in „*Chlorochromatium aggregatum*“. *J. Bacteriol.* **190**, 3721-3730.
- Weinberg, M.V., Jenney Jr., F.E., Cui, X. and Adams M.W.W. (2004). Rubrerythrin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a rubredoxin-dependent, iron-containing Peroxidase. *J. Bacteriol.* **186**, 7888–7895.
- Weiner, A. (2010). Interaktionen von *Pyrococcus furiosus* mit methanogenen Archaea. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Wilkinson, D.M. (2001). At cross purposes. *Nature*. **412**, 485.
- Weis, R.M., Hirai, T., Chalah, A., Kessel, M., Peters, P.J. and Subramaniam, S. (2003). Electron microscopic analysis of membrane assemblies formed by the bacterial chemotaxis receptor Tsr. *J. Bacteriol.* **185**, 3636-3643.
- Wimmer, N. (2007). Expression und funktionelle Charakterisierung von Teilbereichen des archaeellen Flagellins FlaB2 aus *Pyrococcus furiosus*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Wirth, R., Bellack, A., Bertl, M., Bilek, Y., Heimerl, T., Herzog, B., Leisner, M., Probst, A., Rachel, R., Sarbu, C., Schopf, S. and Wanner, G. (2011). The mode of cell wall growth in selected archaea follows the general mode of cell wall growth in bacteria - an analysis using fluorescent dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1556-1562.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4576-4579.
- Yip, K.S., Stillman, T.J., Britton, K.L., Artymiuk, P.J., Baker, P.J., Sedelnikova, S.E., Engel, P.C., Pasquo, A., Chiaraluce, R. and Consalvi, V. (1995). The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure*. **3**, 1147-1158.
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S.C., Ester, M., Foster, L.J. and Brinkman, F.S.L. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*. **26**, 1608-1615.
- Zach, F. (2009). Analyse von Glykoproteinen von *Pyrococcus furiosus*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Zavarzin, G.A. (2006). Winogradsky and modern microbiology. *Microbiology*. **75**, 501-511.
- Zolghadr, B., Klingl, A., Koerdt, A., Driessen, A.J.M., Rachel, R. and Albers, S.-V. (2010). Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* **192**, 104–110.

## **Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne.....**

**Herrn Prof. Dr. Wirth**, meinen Doktorvater, der immer mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn nötig, mir aber auch die Freiheit ließ, um selbständig zu arbeiten und eigene Ideen in die Tat umzusetzen.

**Herrn Prof. Dr. Rachel**, dem ich all mein Wissen in Bezug auf EM verdanke.

**Herrn Prof. Dr. Wanner**, der alle in dieser Arbeit gezeigten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen gemacht hat.

**Herrn Prof. Dr. Thomm**, der mir die Möglichkeit gab, an seinem Lehrstuhl diese Arbeit anzufertigen.

**Dr. Christine Moissl-Eichinger**, die immer ein offenes Ohr und nützliche Tipps für alle auch noch so kleinen Probleme hatte, egal ob wissenschaftlich oder nicht.

**Christian Sarbu**, die meine allererste Praktikantin war und mir über die Jahre hinweg zu einer guten Freundin geworden ist.

**Andreas „Flash“ Klingl, Petra Schwendner, Yvonne Bilek, Alexander Probst und Annett Bellack**, die mich ein Stück auf meinem Weg in Richtung Dissertation begleitet haben und wertvolle Freunde und Berater in so manch kritischen Situationen waren. Danke für die vielen Gespräche, die lustigen und auch nachdenklichen Momente. Ihr seid eine Bereicherung für jedes Labor! Danke auch an all die zahlreichen Diplomanden und Praktikanten, die den Laboralltag stets bereichert haben.

**Alle weiteren Mitglieder des Lehrstuhls für Mikrobiologie**, die ein wichtiger Bestandteil bei allen gemeinsamen Festen und Unternehmungen waren, bei denen ich mich stets willkommen gefühlt habe.

**Stefan und Jonathan**, meiner kleinen Familie, weil für mich nun vieles endlich einen Sinn ergibt.

**Meinen Eltern Hans und Rosmarie und meiner Schwester Steffi**, für einfach alles, was ihr jemals für mich getan habt!



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benützt habe.

Regensburg, März 2011